

Aus der Abt. f. Experimentelle Chirurgie/Molekularbiologie
Leiter: Prof. Dr. W. Dubiel
Klinik f. Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. J. M. Müller
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss des HIV-1 Tat-Proteins auf das Proteasom-System und die Folgen für die zelluläre Immunabwehr

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Xiaohua Huang
aus Hubei, Volksrepublik China

Dekan: Prof. Dr. med. J.W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. W. Dubiel
 2. PD Dr. R. Stohwasser
 3. PD Dr. M. Ziegler

Datum der Promotion: 13.05.2002

Zusammenfassung

Das HIV-1 Tat-Protein hemmt die Peptidase-Aktivität des 20S Proteasoms durch Konkurrenz mit dem 11S Regulator/PA28 um die Bindungsstelle am Proteasom. Aus den kinetischen Daten und durch Strukturvergleiche geht hervor, dass die Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 des Tat-Proteins für den Effekt auf das 20S Proteasom verantwortlich sind und die REG/Tat-Proteasom-Bindungsstelle bilden. Eine in der 11S Regulator alpha-Untereinheit (REG alpha) identifizierte vergleichbare Struktur wird von den Aminosäuren Glu235, Lys236 und Lys239 gebildet. Durch eine Mutation der REG alpha Aminosäuren Glu235 und Lys236 zu Ala geht die Fähigkeit des REG alpha die Peptidase-Aktivität des 20S Proteasoms zu stimulieren verloren, während die Bindungsfähigkeit an den 20S Komplex erhalten bleibt. Die Bindungsstelle in REG alpha ist für die verstärkte Präsentation eines Epitops des Cytomegalovirus pp89 durch MHC Klasse I essentiell. Das Tat-Protein und das Tat-Peptid 37-72 unterdrücken die 11S-Regulator vermittelte Antigenpräsentation des pp89 Epitops. Im Gegensatz dazu weist das Tat-Peptid mit Mutation der Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 zu Ala keine Reduktion der Antigenpräsentation auf.

Abstract

The HIV-1 Tat protein inhibits the peptidase activity of the 20S proteasome and competes with the 11S regulator/PA28. Kinetic assays and structural comparison found amino acids Lys51, Arg52 and Asp67 of Tat to be responsible for the effects on proteasomes, forming the REG/Tat-proteasome-binding site. A similar site identified in the 11S regulator alpha subunit (REG alpha) consists of the residues Glu235, Lys236 and Lys239. Mutation of the REG alpha amino acids Glu235 and Lys236 to Ala resulted in a REG alpha mutant that lost the ability to activate the 20S proteasome even though it still binds to the 20S complex. The site in REG alpha is needed to enhance the presentation of a cytomegalovirus pp89 protein-derived epitope by MHC class I molecules. Full-length Tat and the Tat peptide 37-72 suppressed 11S regulator-mediated presentation of the pp89 epitope. In contrast, a Tat peptide with mutation of amino acids Lys51, Arg52 and Asp67 to Ala was not able to reduce antigen presentation.

Schlagwörter:

Humanes Immundefizienzvirus-1, Tat, 20S Proteasom, 11S Regulator/PA28, Antigenpräsentation

Keywords:

human immunodeficiency virus-1, tat, 20S proteasome, 11S regulator/PA28, antigen presentation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	HIV-1	1
1.2	Das Tat-Protein	2
1.3	Das Proteasom-System	3
1.4	Der 11S Regulator und seine Rolle bei der Antigenpräsentation	4
1.5	Die Regulation der Stabilität von I κ B und c-Jun durch das Proteasom-System	5
1.6	Fragestellungen und Ziele	5
2	Material und Methoden	6
2.1	Material	6
2.1.1	Kits	6
2.1.2	Enzyme	6
2.1.3	Sonstiges	6
2.1.4	Geräte	7
2.2	Methoden	8
2.2.1	Amplifikation von DNA durch PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	8
2.2.2	Klonierung von pcDNA3-Flag-Tat und pcDNA3-Flag- Δ Tat (Abkürzung: Flag-Tat und Flag- Δ Tat)	9
2.2.3	Spezifische Mutagenese der REG α -Untereinheit	10
2.2.4	Umklonierung von pcDNA3.1-HisC-REG α wt und pcDNA3.1-HisC-REG α m (Abkürzung: HisC-REG α wt und HisC-REG α m)	10
2.2.5	Agarosegele, Gelreinigung von DNA-Fragmenten und DNA-Fällung	10
2.2.6	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen und Ligation	11
2.2.7	Anzucht von <i>E.coli</i>	11
2.2.8	Kompetente <i>E. coli</i> -Zellen	11
2.2.9	Transformation	12
2.2.10	Plasmid-Isolierung („Mini-Präp“ und „Maxi-Präp“)	12
2.2.11	Zellen und Zellkultur	12
2.2.12	Transfektion mit der Lipid-Methode	13
2.2.13	Lyse der Zellen	13
2.2.14	Trichloressigsäure (TCE)-Präzipitation	14
2.2.15	SDS-PAGE Elektrophorese	14
2.2.16	Nicht-denaturierende Gelelektrophorese	14
2.2.17	Dichtegradientenzentrifugation	14
2.2.18	Western Blot	14
2.2.19	Immunpräzipitation (IP)	15
2.2.20	Bestimmung der Proteinkonzentration	15

2.2.21	Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine	15
2.2.22	Durchführung von Proteaseassays mit fluorogenen Substraten	16
2.2.23	Dot-Blot	18
2.2.24	Inkubation der Tat Peptide und des vollständiges Tat-Proteins mit B8 Zellen	18
2.2.25	Herstellung stabiler Transfektanten von REG α wt und REG α m	18
2.2.26	CTL-Messung	19
2.2.27	Vergleich der Struktur des Tat-Proteins mit der von REG α	19
3	Ergebnisse	20
3.1	Die Aminosäuren 37-72 des Tat-Proteins sind essentiell für die Bindung an die Proteasomen in HeLa Zellen	20
3.2	Die basische Domäne des Tat-Proteins spielt bei der Inhibition des 20S Proteasoms eine entscheidende Rolle	21
3.3	Das Tat-Peptid 37-72 konkurriert mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom	23
3.4	Identifizierung einer gemeinsamen Struktur im Tat-Protein und in der 11S Regulator α -Untereinheit (REG α)	23
3.5	Herstellung des rekombinanten REG α wt, REG α m und REG β	25
3.6	Messung der Chymotrypsin-ähnlichen 20S Proteasom-Aktivität in Anwesenheit von REG α wt, REG α m mit oder ohne REG β in vitro	26
3.7	Die Mutation der rekombinanten REG α -Untereinheit hat keinen Einfluss auf die Komplexbildung mit sich selbst oder mit dem REG β oder mit dem 20S Proteasom	28
3.8	Die Mutation des Tat-Peptides 37-72 (Tatpep1) in den Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 (Tatpep5) verhindert die Konkurrenz mit dem 11S Regulator	29
3.9	Der Einfluss des Tat-Proteins und der Tat-Peptide (Tatpep1 und Tatpep5) auf die Antigenpräsentation in vivo	31
3.10	Herstellungen stabiler Transfektanten mit REG α wt und REG α m und deren Rolle bei der Antigenpräsentation	33
3.11	Der Einfluss des Tat-Proteins auf die Stabilität der Transkriptionsregulatoren I κ B α und c-Jun in vivo	33
4	Diskussion	35
4.1	Der Effekt des Tat-Proteins auf das 20S Proteasom in vitro und in vivo	35
4.2	Das Tat-Protein beeinflusst die Stabilität der Transkriptionsregulatoren I κ B α und c-Jun	35
4.3	Identifizierung einer gemeinsamen Struktur im HIV-1 Tat-Protein und in der 11S Regulator α -Untereinheit, die für die Konkurrenz der beiden Proteine verantwortlich ist	36
4.4	Das Tat-Protein hemmt die 11S Regulator-vermittelte Antigenpräsentation	37
5	Zusammenfassung	39

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin (Ala)
Å	Angström
AA	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
Abb.	Abbildung
AMC	7-Amido-Methylcumarin
C	Cystein
cpm	<i>counts per minute</i>
CTL	cytotoxische T-Lymphocyten
D	Aspartat (Asp)
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
E	Glutamat (Glu)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii (und andere)</i>
F	Phenylalanin
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G	Glycin
g	Gramm, Vielfaches der Erdbeschleunigung (x g)
H	Histidin
h	Stunde (n)
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin (Met)
M	molar
max	maximal
MCMV	<i>murine cytomegalo virus</i>
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute (n)
mM	millimolar

MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
N	Asparagin
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Glutamin
R	Arginin (Arg)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulphate</i>)
sec	Sekunde (n)
T	Threonin
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCE	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin
V	Valin (Val)
V	Volt
Vh	Voltstunde
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
γ -INF	γ -Interferon

1 Einleitung

1.1 HIV-1

Das HIV-1 (Das Humane Immundefizienzvirus-1) ist der Erreger des erworbenen Immundefektsyndroms (*Acquired-Immune-Deficiency-Syndrome*, AIDS). Es überzieht die Erde in einer Pandemie (*Piot et al., 2001*). Infolge der Immunschwäche treten opportunistische Infektionen auf (*Dal Maso et al., 2001*). Die Erkrankung verläuft fast immer tödlich. Nachdem Montagniers Arbeitsgruppe am Pasteur Institut in Paris die Isolierung eines Retro-Virus aus Lymphozyten eines jungen Homosexuellen mit den Krankheitszeichen des Lymphadenopathie-Syndroms im Jahre 1983 und Gallos Arbeitsgruppe in den USA die Isolierung ähnlicher Retro-Viren von Patienten im Jahre 1984 gelungen waren (*Barre-Sinoussi et al., 1983; Gelmann et al., 1984*), wurde das HIV-2 in Westafrika aus AIDS-Patienten im Jahre 1986 isoliert (*Glavel et al., 1986*). Das HIV-2 ist mit dem HIV-1 verwandt aber nicht identisch. Bei Kreuztests zeigte sich, dass die Glykoproteine der Virushülle bei HIV-1 und HIV-2 völlig verschieden sind. Die Polymerasen und die Kapsid-Antigene ließen jedoch eine Verwandtschaft zwischen HIV-1 und -2 erkennen. HIV-1 und HIV-2 gehören also zu derselben Gruppe von Viren (HIV). Das HIV wird durch homo- oder heterosexuellen Geschlechtsverkehr sowie durch Blut oder Blutprodukte übertragen. Neben dem Blut sind das Sperma und das Vaginalsekret ebenfalls Infektionsquellen. Die Infektion der Neugeborenen durch seropositive Mütter erfolgt vorwiegend perinatal, aber auch durch das Stillen (*Saloojee et al., 2001*).

Die HIV-1-Adsorption erfolgt durch Anlagerung des gp120 (ein Glykoprotein, das Genprodukt des Env-Gens) an die CD4- sowie an CCR5- bzw. CXCR4-Chemokin-Rezeptoren der CD4+- Zelle (*Dragic, 2001*). Das HIV-1 wird dann durch Fusion und Endozytose von der Zelle aufgenommen (*Penetration*). Nach dem *Uncoating* erfolgt im Zytoplasma die reverse Transkription und anschließend der Transport der DNA in den Kern mit der Integration in das Zellgenom (*Provirus*). Zelluläre Transkriptasen produzieren dann virale mRNAs und Genom-RNA. Nach der Translation an den Polysomen erfolgt die Spaltung der Vorläuferproteine in kleinere Moleküle. Dann erfolgt die Montage neuer Viruspartikel an der Zellmembran, die durch Knospung (*budding*) freigesetzt werden (*Faure et al., 2000*). Insgesamt gesehen ist die Kontagiosität des HIV geringer als die des Hepatitis B-Virus. Das HIV ist wegen seiner lipidhaltigen Hülle sehr empfindlich gegenüber Lipidlösungsmitteln. Außerhalb des Organismus verliert es durch Austrocknen nach mehreren Stunden 90-99% seiner Infektiosität. Bisher sind nur wenige Infektionen durch kontaminierte Kanülen bei ärztlichem Personal bekannt geworden. Weltweit schätzt man bisher über 50 Millionen Infizierte, und 1998 waren 2,5 Millionen an AIDS erkrankte Personen gestorben. Die Zahl der klinisch Kranken steigt dramatisch. Sie verdoppelt sich etwa alle 3-5 Jahre (*Yamey et al., 2001; Adler, 2001*). Die Gesamtzahl der Infizierten in Deutschland wird auf 60 000 geschätzt, und über 10 000 sind bisher an AIDS gestorben. Deshalb ist die Identifizierung und die Erforschung der HIV-Genomsstruktur und –Pathogenese ein wichtiges und dringendes Projekt in den Fächern Medizin und Biologie.

Das durch das HIV ausgelöste AIDS ist ein Krankheitskomplex. Die Inkubationsperiode beträgt 1-15 Jahre. Man beobachtet Gewichtsabnahme, Schwächezustände, Fieber sowie zahlreiche opportunistische Infektionen (z.B. Pneumonie, orale Haarleukoplakie). Charakteristisch für AIDS ist das Auftreten des Kaposi-Sarkoms (*Beral et al., 1990*). Die serologisch-virologische Diagnose erfolgt zunächst durch einen Antikörper-Screening-ELISA gegen das Kern- und das Env-Antigen. HIV-spezifische Antikörper sind etwa ab der dritten Woche nach der Infektion nachweisbar. Jeder Verdachtsfall wird dann durch einen „Bestätigungstest“ (*Western Blot*) und den IFT (*Immunofluorescence Test*) abgeklärt. Der quantitative Nachweis von HIV-RNA erfolgt durch die PCR und alternative Amplifikationstechniken (*bdNA: branched-DNA; NASBA, nucleic acid sequence-based Amplification*) (*Kellogg et al., 2001; de Baar et al., 2001*). Um den klinischen Verlauf zu beurteilen, ist es wichtig, das Verhältnis von CD4/CD8-Zellen zu bestimmen. Der kritische Wert liegt bei 200 CD4+-Zellen/ μ l.

Man ist bisher nicht in der Lage, die Replikation von HIV im menschlichen Körper erfolgreich zu verhindern und das HIV in den Patienten zu eliminieren. Trotzdem hat die Kombination von z. B. AZT (Nukleotid-Reverse-Transkriptase-Inhibitor) mit Nevirapin (Nonnukleosid-Hemmstoff, NNRTI) und einem Protease-Inhibitor (PI) deutliche Fortschritte bei der Behandlung gebracht (*Brockmeyer*

et al., 1999). Bisher ist noch kein Impfstoff in Sicht. Die Schwierigkeiten mit einem Vakzin gegen das HIV liegen darin, dass mehrere HIV-Typen, Subtypen und Varianten vorkommen (Kusumi et al., 1992).

Die HIV-1-RNA hat einen Informationsgehalt von etwa 9 Kb. In jedem Virus-Partikel gibt es zwei identische (+)-RNA-Stämme. Durch die hohe Mutationsrate können „Quasispezies“ entstehen. Das Genom des HIV-1 besteht aus Regulationssequenzen und Genen, die in Abb. 1.1 dargestellt sind.

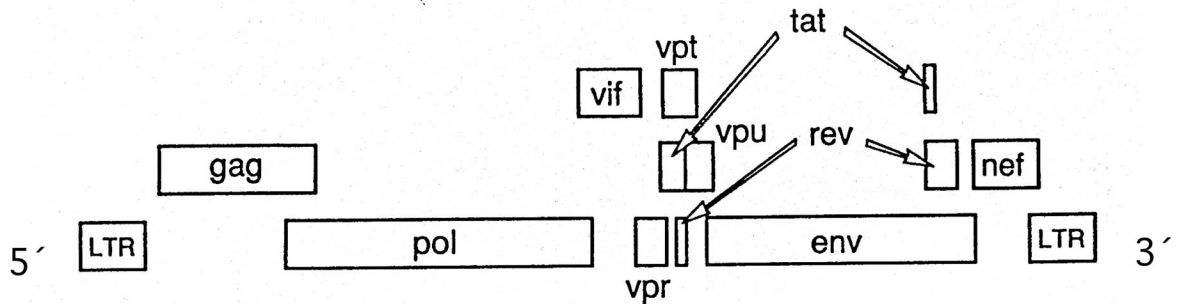


Abb. 1.1: Übersicht über die Gene des HIV-1 Provirus und ihre Anordnung

1.2 Das Tat-Protein

Das Tat-Gen entsteht durch das Zusammenfügen von zwei Regionen des Virus-Genoms (*Transactivation transcription*) durch Spleißen. Das Tat-Protein ist essentiell für die virale Replikation und in allen Lentiviren von Primaten konserviert (Jeang et al., 1994; Gallo, 1999). Im HIV-1-infizierten Patient wird ein Tat-Protein gefunden, das aus 101 Aminosäuren besteht. Das sogenannte vollständige Tat-Protein bestehend aus 86 Aminosäuren wurde durch die Zellkultur im Labor produziert und existiert nicht in der Natur (Rana et al., 1999). Es wurde jedoch von vielen Forschern bestätigt, dass das 86-Aminosäuren-Tat-Protein genau wie das 101-Aminosäuren-Tat-Protein funktioniert.

Das 86-Aminosäuren-Tat-Protein wird von zwei Exons kodiert. Die ersten 72 Aminosäuren werden von dem ersten Exon kodiert, die übrigen 14 C-terminalen Aminosäuren vom zweiten Exon. Das Tat-Protein besteht aus 5 Domänen; einer N-Terminalen-, einer Cystein-reichen-, einer Kern-, einer Basischen und einer C-Terminalen- Region. Die basische Region enthält die RNA-Bindungsdomäne und ein NLS (*Nuclear Localization Signal*). Außerdem ist sie zuständig für den freien Durchgang durch die zelluläre Membran. Im Gegensatz dazu bindet die Cystein-reiche Region unspezifisch an viele Komplexe und ist für die Oligomerisierung des Tat-Proteins zuständig (Rana et al., 1999). Die Deletion dieser Region vereinfacht die Analyse des Tat-Proteins (siehe Abb. 1.2).

1.4 Der 11S Regulator und seine Rolle bei der Antigenpräsentation

Der 11S Regulator, auch PA28 oder REG genannt, ist eine Komponente des Immunabwehr-Systems. Er kann ATP-unabhängig mit den α -Endplatten des 20S Proteasoms assoziieren (Dubiel et al., 1992; Ma et al., 1992; Realini et al., 1994). Er konnte nur in höheren eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden. Der 11S Regulator besteht aus zwei Untereinheiten, REG α und REG β , die annähernd 50% Sequenzhomologie aufweisen. Das Molekulargewicht der α -Untereinheit beträgt 28,7 kDa und das der β -Untereinheit 27,1 kDa. REG α besteht aus 249 Aminosäuren (Ahn et al., 1996; Song et al., 1996). Die Bindungsstelle des REG α mit dem 20S Proteasom befindet sich am C-Terminus (Aminosäuren 240-249). Der 11S Regulator bildet eine Art Kappe, die sich aus sechs oder sieben α - und β -Untereinheiten zusammensetzt (Gray et al., 1994). Biochemische Daten verschiedener Arbeitsgruppen sprechen für ein Hetero-Hexamere, das zu gleichen Teilen aus α - und β -Untereinheiten gebildet wird (Ahn et al., 1996; Kuehn et al., 1996). Im Gegensatz dazu formt das rekombinante REG α alleine einen heptameren Ring, wie durch röntgenkristallographische Studien bestimmt wurde (Whitby et al., 2000; Knowlton et al., 1997). Die sieben 11S Regulator α -Untereinheiten bilden eine zentrale Öffnung von 20 Å auf der dem Proteasom abgewandten Seite und eine Öffnung von 30 Å auf der Seite, die an den heptameren α -Ring des Proteasoms bindet. Es wurde bisher nicht gezeigt, ob der homo-heptamere Komplex tatsächlich in der Zelle vorliegt. Die Untereinheiten des 11S Regulators besitzen 40% (REG α) bzw. 33% (REG β) Sequenzhomologie zu einem Kernprotein, welches ein Autoantigen bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematosus darstellt. Die Funktion dieses sogenannten Ki-Antigens ist bisher unbekannt (Nikaido et al., 1990). Die Interaktion des 11S Regulators mit dem 20S Proteasom führt zu einer vielfachen Stimulierung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in vitro (Dubiel et al., 1992). Sowohl rekombinanter als auch isolierter 11S Regulator kann das 20S Proteasom aktivieren (Realini et al., 1994). Für die Aktivierung des 20S Proteasoms sind die Aminosäuren 141-149 erforderlich (Knowlton et al., 1997).

Der 11S Regulator spielt bei der Prozessierung antigenen Peptide für MHC-Klasse-I Moleküle eine wesentliche Rolle (Rechsteiner et al., 2000; Klockel, 2001). Das 20S Proteasom gemeinsam mit dem 11S Regulator ist nicht in der Lage, große Proteinsubstrate abzubauen. Dafür ist ein anderer 20S Proteasom-Regulator, der 19S Regulator, zuständig. Dieser bindet ATP-abhängig an die Endplatten des 20S Proteasoms und bildet so das ca. 2000 kDa große 26S Proteasom (Peters et al., 1993; Yoshimura et al., 1993). Das 26S Proteasom erkennt ubiquitinierte Proteine und baut sie ab. Interessanterweise wurden TBP1 (*Tat-Binding Protein 1*) und MSS1 (*Mammalian Suppressor of Sgv1*), zwei ATPase-Untereinheiten des 19S Regulators, über direkte bzw. indirekte Wechselwirkung mit dem Tat-Protein identifiziert (Dubiel et al., 1993).

Das von aktivierten TH1-Zellen sezernierte γ -Interferon führt in MHC-Klasse I-Peptid-präsentierenden Zelle zur Expression zahlreicher an der Immunantwort beteiligter Proteine (Billiau, 1996). Unter ihnen sind drei proteolytisch aktive β -Untereinheiten des 20S Proteasoms (LMP2, *low molecular weight protein 2*, LMP7 und MECL-1, *multicatalytic endopeptidase complex-like 1*), die an Stelle von β 1, β 5 und β 2 in das 20S Proteasom eingebaut werden und so das Immunoproteasom bilden (Ortiz-Navarrete et al., 1991; Kelly et al., 1991; Groettrup et al., 1996a). Darüber hinaus werden der ER-Peptidtransporter TAP (*Transporter Associated with Antigen Processing*) (Higgins, 1992), die MHC Klasse I schwere Kette β 2 Mikroglobulin (Lehner et al., 1996) und der 11S Regulator durch das γ -Interferon induziert (Ahn et al., 1995). Das sogenannte Immunoproteasom hat eine veränderte peptidspaltende Aktivität in vitro. Es schneidet vorzugsweise nach hydrophoben und basischen Resten und generiert somit die Peptide, die eine erhöhte Affinität zum TAP-Transporter und zu MHC-Klasse-I Molekülen besitzen. Das Immunoproteasom zeigt in vitro eine erhöhte chymotryptische und tryptische Aktivität. Im Gegensatz dazu verringert sich die peptidylglutamylspaltende Aktivität (Gaczynska et al., 1993; Tanaka et al., 1997; Sijts et al., 2000). Der ebenfalls γ -IFN-induzierbare 11S Regulator steigert vermutlich die Effektivität der Antigenpräsentation, indem er das Proteasom befähigt, immunodominante Peptide sowie deren Vorläufer in größeren Mengen zu produzieren. In vitro Verdauung langer Polypeptidsubstrate belegen, dass der 11S Regulator die Generierung von

Epitopen und möglichen Vorläuferpeptiden bis zu 100-fach verstärkt (*Dick et al., 1996; Shimbara et al., 1997*). In vivo wurde gezeigt, dass die Überexpression von REG α in Mausfibroblasten eine verbesserte Antigenpräsentation durch MHC-Klasse-I Moleküle zur Folge hat (*Groettrup et al., 1996c*). Für die Funktionen des 20S Proteasoms, des 11S Regulators und des 19S Regulators bei der Prozessierung antigener Peptide existiert ein Modell. In der Zelle scheint das 20S Proteasom gleichzeitig mit dem 19S Regulator und dem 11S Regulator assoziiert zu sein. Es wurde postuliert, dass die Erkennung von Proteinsubstraten und der Zugang zum katalytischen Kompartiment durch den 19S Regulator an einer Seite des 20S Proteasoms ermöglicht wird und dass der weitere Abbau der entstandenen Intermediate durch den 11S Regulator auf der anderen Seite des 20S Proteasoms reguliert wird (*Hendil et al., 1998*).

1.5 Die Regulation der Stabilität von I κ B und c-Jun durch das Proteasom-System

NF- κ B (*Nuclear Factor- κ B*) spielt bei der transkriptionellen Regulation im Zellkern eine wichtige Rolle. Es gibt zwei Wege, durch die NF- κ B im Cytoplasma freigesetzt wird und in den Zellkern geht. Der Inhibitor I κ B α bindet an das NF- κ B-Heterodimer, das aus den Proteinen p50 und p65 besteht und verhindert den Eintritt in den Zellkern. Infolge einer spezifischen Stimulation wird I κ B α phosphoryliert, anschließend polyubiquitinyliert und vom 26S Proteasom abgebaut (*Traenckner et al., 1995; Chen et al., 1995*). Beim alternativen Mechanismus wird das an p65 bindende Präkursor-Protein p105 durch das Ubiquitin-abhängige 26S Proteasom prozessiert und damit ein aktives Heterodimer aus p50 und p65 hergestellt (*Palombella et al., 1994*). Das Prozessieren von p105 ist das einzige bisher bekannte Beispiel für eine begrenzte Proteolyse eines Substrates durch das 26S Proteasom. NF- κ B wird in den Nucleus transloziert und bindet dort an seine DNA-Zielsequenzen. Es ist auch für die Replikation des HIV-1 erforderlich (*Westendorp et al., 1995*).

Das c-Jun ist ein Mitglied der AP-1-Familie (*Karin et al., 1997*). Die Proteine der AP-1 Familie sind in der Lage, die Transkription bestimmter Gene durch die Bindung an spezielle *DNA-responsive elements* zu induzieren. Die Expression von c-Jun wird durch verschiedene extrazelluläre Stimuli erhöht. Die intrazelluläre Stabilität von c-Jun wird durch das Proteasom-System Ubiquitin-abhängig reguliert (*Jarriel-Encontre et al., 1995*).

1.6 Fragestellungen und Ziele

Im Jahre 1997 fanden die Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, dass das Tat-Protein in der Lage ist, an das 20S Proteasom sowie auch an den 19S Regulator des 26S Proteasoms in vitro zu binden. Die Tat-Bindung an das 20S Proteasom führt zu einer Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität. Aus kinetischen Daten und den in Bindungsstudien gewonnen Erkenntnissen geht hervor, dass das Tat-Protein mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom konkurriert.

Daraus ergaben sich die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit:

1. Bindet das Tat-Protein in vivo an das 20S Proteasom und den 19S Regulator des 26S Proteasoms?
2. Welche Region des Tat-Proteins ist für die Konkurrenz mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom verantwortlich? Gibt es ähnliche Strukturen im Tat-Protein und im 11S Regulator?
3. Hat das Tat-Protein einen Einfluß auf die 11S Regulator-vermittelte Antigenpräsentation über die MHC Klasse-I Moleküle?
4. Beeinflusst das Tat-Protein die Stabilität von I κ B und c-Jun ?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Kits

Biorad protein assay	Biorad
BM chemiluminescence western blotting reagent	Boehringer Mannheim
Endofree Maxi Plasmidkit	Qiagen
Mini Plasmidkit	Qiagen
Perfect™ Transfection Kit	Invitrogen
Qiaquick Gelreinigungskit	Qiagen
Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Thrombin-Cleavage-Capture-Kit	Novagen

2.1.2 Enzyme

Restriktionsenzyme	Biolabs
T4 Bakteriophage DNA Polymerase	Biolabs
T4 DNA-Ligase	Roche
Taq-Polymerase	Roche

2.1.3 Sonstiges

3MM Papier	Whatman
Acrylamid 30 %, 29:1	Roth
Aprotinin	Applichem
Bacto-Agar	DIFCO
Bacto-Trypton	DIFCO
Centricon	Amicon/Millipore
DMSO	Fluka
Elektroporationsküvetten	Peqlab
FCS	Seromed
Fluorogene Proteasom Substrate	Bachem Biochemica
Hefe-Extrakt	DIFCO

IgG-Standard	Biolab
Glutathion-Agarose	Sigma
L-Glutamin	Seromed
Lactacystin	Affiniti
Mikroliterspritze	Hamilton
Molekulargewichtsstandard, DNA	GibcoBRL
Molekulargewichtsstandard, Protein	Amersham
Nitrocellulose Membran	Schleicher&Schuell
Penicillin/Streptomycin	Seromed
Phast-System, Nativ-Gel-Pufferstreifen	Pharmacia
PMSF	Sigma
pcDNA3.1 Vektor	Invitrogen
Röntgenfilme	Kodak
Schwarze Mikrotiter-Platten	Dynatec
Sekundärantikörper	Seramun
Steriles Plastikmaterial für die Zellkultur	Falcon
Sterilfilter	Microgen
TEMED	Serva
Trypanblau-Lösung	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Zellkultur-Medien	Seromed
Zephiranchlorid, 17 %	ICN
β-Mercaptoethanol	Serva

2.1.4 Geräte

Agarosegelkammer Geltray	Renner
Eismaschine AF-10	Scotsman
Elektroporationsgerät	Peqlab
Feinwaage MC1	Satorius
Fluorimeter Fluostar Reader	SLT
French Press	SIM-AMINCO
Geltrockner Drystar	Hölzel
Heizblock	Eppendorf
Inverses Mikroskop DMI	Leica
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf

Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman
Kühlzentrifuge RC24	Sorvall
Magnetrührer	Heidolph
Medifuge	Heraeus
Membranvakuumpumpe	Vacuumbrand
Mikrowelle	Moulinex
MilliQ-Anlage	Millipore
Mixer 5432	Eppendorf
PCR Thermocycler UNO Block	Biometra
Phast Gel System	Pharmacia
Photometer	Shimadzu
Pipetten	Gilson
Pipettus-Akku	Hirschmann
Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor	Amersham
Rotor SS34	Sorvall
Rotor SW40	Beckman
Schüttlerwasserbad	GFL
Schüttler	Infos
Sterilbank	Baker
Stickstofftank	Taylor-Wharton
Tischultrazentrifuge Optima TLX	Beckman
Ultrazentrifuge Ultra Pro 80	Sorvall
Vakuumtrockner	Labcono
Mischer Vortex VF2	Janke & Kunkel
Waage BP2100S	Sartorius
Wasserbad U3	Julabo
Zellkultur-Inkubator BB4220CV	Heraeus

2.2 Methoden

2.2.1 Amplifikation von DNA durch PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Primer für 86-AA Tat und Tat-Fragment DNA-Konstrukte (5' → 3')

Primer A: ACG TGG ATC CTG ATG GAG CCA GTA GAT CCT AGA

Primer B: TCG CTC GAG CTA TTC CTT CGG GCC TGT CGG

Primer C: ACG TAC GTT ACC TTG GCA ATG AAA GCA ACA

Primer D: ACG TGG TAC CCC ACC TCC CAA TCC CGA GGG

PCR-Ansatz (100 µl):

- 2 µl DNA (10 ng/µl)
- Je 2 µl Primer (0.1 µg/ml)
- 10 µl 10 x PCR-Puffer
- 8 µl MgCl₂ (25 mM)
- je 2 µl dNTP (0,2 mM)
- 0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 U)
- aqua dest. ad 100 µl

Die Template-DNA (GST-Tat Konstrukt von *NIH AIDS Reagent Program*, USA) und die Oligonukleotide wurden vor der PCR 3 min bei 95°C denaturiert. Es wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt: 1 min, 95°C; 45 sec, 52°C; 45 sec, 72°C; 33 Zyklen; 5 min, 72°C. Um die gewünschten amplifizierten Fragmente von sonstiger DNA im PCR-Ansatz zu trennen, wurde der gesamte Reaktionsansatz auf ein präparatives 1%iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden ausgeschnitten und mit einem Gel-Extraktions-Kit von QIAGEN isoliert.

2.2.2 Klonierung von pcDNA3-Flag-Tat und pcDNA3-Flag-ΔTat (Abkürzung: Flag-Tat und Flag-ΔTat)

Flag-Tat: Mittels PCR wurden die kodierenden DNA-Fragmente für Tat 1-86 amplifiziert. Dabei wurden der Primer 1 mit einer N-terminalen-BamHI-Schnittstelle, der Primer 2 mit einer C-terminalen-XhoI Schnittstelle und pGEX 2TK-Tat 1-86 als Matrize benutzt. Nach entsprechendem Restriktionsverdau wurde Tat-cDNA gerichtet über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3-Flag ligiert. Die Ligation wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

Flag-ΔTat: Mittels PCR wurde Tat-DNA 1-36 mit Primer 1 mit einer N-terminalen-BamHI-Schnittstelle und Primer 3 mit einer C-terminalen-KspA1-Schnittstelle sowie pGEX 2TK-Tat-DNA 1-86 als Matrize amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und KspA1 verdaut.

Mittels PCR wurde Tat-DNA 73-86 mit Primer 4 mit einer N-terminalen-KpnI-Schnittstelle und Primer 2 mit einer C-terminalen-XhoI-Schnittstelle und pGEX 2TK als Matrize amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI verdaut. Die überstehenden Nukleotide wurden weiter mit T4 Bakteriophagen-DNA-Polymerase abgebaut. Danach erfolgte die stumpfe-Enden (*blunt-end*) Ligation der behandelten Tat-DNA 1-36 und Tat-DNA 73-86. Nach der Ligation wurde die ligierte DNA mit Primer 1 mit einer N-terminalen-BamHI-Schnittstelle und Primer 2 mit einer C-terminalen-XhoI-Schnittstelle sowie den Ligationsprodukten als Matrize amplifiziert. Nach entsprechendem Restriktionsverdau wurde ΔTat-cDNA gerichtet über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3-Flag ligiert. Die Ligation wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

2.2.3 Spezifische Mutagenese der REG α -Untereinheit

Primer für REG α (5' → 3')

Primer E: CCT GAA GAA CTT CGC GGC GCT CAA GAA GCC C

Primer F: GGG CTT CTT GAG CGC CGC GAA GTT CTT CAG G

PCR-Ansatz (100 μ l):	10 x PCR-Puffer	10 μ l
	dNTPs (25 mM je dNTP)	0,8 μ l
	DNA Template (100 ng/ μ l)	1 μ l
	Primer E (100 ng/ μ l)	2,5 μ l
	Primer F (100 ng/ μ l)	2,5 μ l
	Pfu Turbo DNA Polymerase	1 μ l (2,5 U)
	Aqua dest. ad 100 μ l	

Entsprechend der Vorschrift des „*Site-directed Mutagenesis Kit*“ wurde das folgende Programm gewählt: 3 min, bei 95°C vordenaturiert; 30 sec, 95°C; 1 min, 55°C; 12 min, 68°C; 12 Zyklen. Um die parentale unmutierte DNA zu verdauen, wurde das Restriktionsenzym Dpn I (1 μ l, 10 U/ μ l) zugegeben. Dann wurde die Transformation in *E. Coli*, *XL-1-Blue*, durchgeführt. Die Mutation wurde mittels DNA-Sequenzierung bestätigt.

2.2.4 Umklonierung von pcDNA3.1-HisC-REG α wt und pcDNA3.1-HisC-REG α m (Abkürzung: HisC-REG α wt und HisC-REG α m)

Für GST α wt und - α m wurde der Vektor pcDNA3.1-HisC aus den Serien pcDNA3.1-His verwendet. Die Vektoren pcDNA3.1-HisC und pGEX 2TK-11 S α wt und - α m wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI geschnitten. Die cDNA-Fragmente von REG α wt und REG α m wurden gerichtet über die Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1-HisC ligiert.

2.2.5 Agarosegele, Gelreinigung von DNA-Fragmenten und DNA-Fällung

50 x Puffer für Agarosegel-Elektrophorese (50 x TAE):	Tris	242 g
	Essigsäure	57,1 ml
	0,5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml
	Bidest, auf 1l	

DNA-Fragmente wurden in 0,8 bis 1,6%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel

enthielt 0,006% Ethidiumbromid (nach Abkühlen der aufgekochten Agarose zugegeben). Die Elektrophorese erfolgte mit 5 V je cm.

Die zu reinigende DNA wurde auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit dem Gelaufreinigungskit Qiaquick der Firma Qiagen nach Firmenvorschrift eluiert.

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat, pH 4,8, versetzt und anschließend wurden 2,5 Volumen 100% Äthanol (kalt) zugegeben. Die Fällung erfolgte bei -70°C oder auf Eis für 30 min. Die DNA wurde 15 min mit $17000 \times g$ bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit 70% Äthanol (kalt) gewaschen (Zentrifugation: 10 min, $17000 \times g$, 4°C) und nach dem Trocknen im Vakuumtrockner in H_2O oder TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

2.2.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen und Ligation

Der Restriktionsverdau von Insert-DNA, Vektor-DNA und zu analysierender Plasmid-DNA wurde mit entsprechenden Enzymen und entsprechenden 10 x Puffern der Firma BIOLABS durchgeführt. Eine Enzymeinheit verdaut 1 μg DNA in 1-3 h (bei optimalen Temperatur- und Pufferbedingungen). Insert- und Vektor-DNA für Klonierungen wurden nach dem Verdau auf ein präparatives 1%iges Agarosegel aufgetragen, um die geschnittenen Oligonucleotidfragmente abzutrennen und damit den Klonierungserfolg zu erhöhen. Die Bestimmung der DNA-Konzentration einer Probe erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doppelstrang-DNA entsprechen $\text{OD}_{260} = 1$.

Ca. 200 ng Vektor wurden mit Insertfragment im Verhältnis 1:3-1:5 pro 20 μl Ligationsansatz mit 200 U T4 DNA-Ligase in Ligationspuffer inkubiert. Die Ligation erfolgte bei 22°C für 2 h oder bei 16°C über Nacht.

2.2.7 Anzucht von *E.coli*

Lösungen:	LB medium (1l)	10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl
	LB Agar (1l)	10 g Baktotrypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Agar
	LB-Amp-Agarplatten	LB Agar, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Amp

Amp-Stammlösung: 50 mg/ml Ampicillin in 50% Äthanol

Glycerinkultur: 1 ml einer Übernachtskultur wurde mit 1 ml sterilem 99% Glycerin gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

Die *E. coli*-Kulturen wurden bei 37°C mit einer Frequenz von 180 pro Minute geschüttelt und bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 1-1,5 inkubiert.

2.2.8 Kompetente *E. coli*-Zellen

Transformationspuffer 1: 100 mM RbCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 30 mM KAc, 10 mM CaCl_2 , 15% (w/v) Glycerin, pH 6,8, eingestellt mit 0,2 M Essigsäure.

Transformationspuffer 2: 10 mM MOPS, pH 7,0, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 15% (w/v) Glycerin.

100 ml LB wurden mit 100 µl einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden mit 2500 rpm für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und in 30 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und anschließend 2 h auf Eis inkubiert. Danach wurde mit 2500 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert und die Zellen in 4 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden in 200 µl-Aliquoten bei –70°C gelagert.

2.2.9 Transformation

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 5-10 µl Ligationsansatz oder anderer Plasmid-DNA (2 ng) wurde der Transformationsansatz 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock von 2 min bei 42°C durchgeführt und danach nochmals 5 min auf Eis inkubiert. Es wurde 1 ml LB Medium zugegeben und 1 h bei 37°C leicht geschüttelt. Dann wurden die Zellen bei 2000 rpm 3 min pelletiert, resuspendiert und ein Volumen von 100 bis 200 µl auf einer LB-Amp-Agarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C.

2.2.10 Plasmid-Isolierung („Mini-Präp“ und „Maxi-Präp“)

Zur Analyse der Klone aus der Transformation wurden von der LB-Amp-Agarplatte Einzelkolonien gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Amp-Medium bei 37°C unter Schütteln kultiviert. Die Plasmidisolation erfolgte nach *Maniatis et al, 1989*. Die Plasmid-DNA aus 1,5 ml Kultur wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Davon wurden 5-10 µl für die Analyse im Restriktionsverdau eingesetzt. Die Verdau wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Für die Vermehrung von Vektor-DNA wurde nach entsprechender Transformation eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt. 300 ml LB-Amp-Medium wurden mit 1 ml Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem „*Endofree Maxiprep Plasmid Kit*“ der Firma Qiagen.

2.2.11 Zellen und Zellkultur

Die B8 Zellen sind eine embryonale Fibroblasten-Zelllinie der Maus. Sie wurden mit dem MCMV IE1-Gen, welches für pp89 Protein kodiert, stabil transfiziert.

HeLa Zellen: *European Tissue Culture Collection*

Medium für HeLa Zellen: RPMI 1640 Medium

10% FCS

100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin

2 mM L-Glutamin

Medium für B8 Zellen (Vollmedium): Basal ISCOVE Medium
 10% FCS
 100 U/100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
 2 mM L-Glutamin

HeLa und B8 Zellen wurden im Medium bei 37°C unter 5% CO₂ kultiviert. Cytolytische T-Lymphozyten wurden wie beschrieben (*Pamer, 1994*) generiert. Das H₂O im Inkubator wurde mit 0,0068% Zephiranchlorid versetzt. Das Medium für B8 enthielt zusätzlich 125 µg/ml G418 (Geneticin). Waren die Zellen konfluent, wurden sie nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und neu ausplattiert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 200 x g für 5 min bei 4°C.

2.2.12 Transfektion mit der Lipid-Methode

Exponentiell wachsende Kulturen wurden einen Tag vor der Transfektion zu ca. 5×10^6 Zellen pro 16 cm-Kulturschale ausplattiert. Für eine Reaktion wurden 30 µg *Endofree* Vektor, 180 µg Lipid fx2 und 8 ml Serumfreies Medium verwendet. Nach 4 h wurde das Medium der Kulturen entfernt und frisches Medium zugegeben. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert.

2.2.13 Lyse der Zellen

Lysepuffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
	150 mM	NaCl
	0,02%	Natriumazid
	0,1%	SDS
	1%	NP-40
	0,5%	Natriumdesoxycholat

1 mM PMSF und 7 µM Aprotinin wurden frisch zugegeben

Das Medium wurde zunächst entfernt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 10 min auf Eis inkubiert. Das eisgekühlte Lysispuffer wurde zugegeben, und mit einem Schaber wurden die Zellen gesammelt. Auf Eis wurden die Zelllysate mit einer 21-Spritze 6 mal angesaugt und 10 min bei 17000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 4 x Proben-Puffer (Firma Roth) 5 min lang gekocht. Die Proben wurden entweder bei 4°C gelagert oder sofort auf das SDS-Gel aufgeladen. Die gleichen Überstände wurden auch für die Nicht-denaturierende Gelelektrophorese oder die Immunopräzipitation verwendet.

2.2.14 Trichloressigsäure (TCE)-Präzipitation

Die Proben wurden mit 10% (Endkonzentration) TCE 20 min auf Eis inkubiert und gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 17000 x g, 4°C) wurden die Pellets einmal mit 5% TCA (10 min, 17000 x g, 4°C) und zweimal mit kaltem Aceton (10 min, 17000 x g, 4°C) gewaschen. Das restliche Aceton wurde bei RT oder 37°C verdampft.

2.2.15 SDS-PAGE Elektrophorese

Lösungen:

4 x Sammelgelpuffer: 250 mM Tris HCl pH 6,8, 0,8% SDS

4 x Trenngelpuffer: 150 mM Tris HCl, pH 8,8, 0,4% SDS

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycerin, 0,1% SDS

Die Proben wurden in 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C im Heizblock erhitzt und anschließend 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Um die Proteinmengen auszugleichen, wurden die Proben zuerst im Photometer bei der OD₂₈₀ gemessen. Für den Lauf durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 70V angelegt und beim Übergang der Proteine ins Trenngel wurde die Spannung auf 140V erhöht.

2.2.16 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Nicht-denaturierende Gelelektrophorese wurde mit dem Phast-System von Pharmacia durchgeführt. Es wurden Gradientengele von 4-15% Acrylamid genutzt. Folgende Laufbedingungen wurden gewählt: 300 Vh bei 10 V, 0,1 mA, 1 W, 4°C.

2.2.17 Dichtegradientenzentrifugation

Mit einem Gradientenmischer wurde ein kontinuierlicher Gradient von 10-40% Glycerin in Beckman SW40-Zentrifugenröhrchen gegossen. 0,3-0,5 ml Proben wurden auf den Gradienten geschichtet und bei 40000 rpm im Beckman SW40-Rotor für 16 h bei 4°C zentrifugiert. Der Gradient wurde von oben nach unten in 600-800 µl Fraktionen aliquotiert. Die Proteine der Fraktionen wurden mit TCE präzipitiert.

2.2.18 Western Blot

Blotpuffer: 14,4 g Glycerin, 3,04 g Tris, auf 1 Liter H₂O

Waschpuffer (PBS-T): 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3 und 0,1% Tween-20

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch (120 mA bei 4°C über Nacht oder 200mA bei RT 2h) auf Nitrocellulose-Membranen überführt und immunochemisch getestet. Die Membran wurde zuerst mit Ponceau S gefärbt und dann mit 5% Milch (in PBS-T) 1-2 h blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem geeigneten Antikörper. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem *BM-Chemiluminescence ECL-Kit* nach der Vorschrift von Boehringer. Die Röntgenfilme (XDS, XAR von KODAK) wurden in der Entwicklerautomaten „Hyperprocessor“ (Amersham) entwickelt.

2.2.19 Immunpräzipitation (IP)

IP-Puffer:	50 mM	Tris/HCl pH 8,5
	150 mM	NaCl
	0,02%	Natriumazid
	0,1%	SDS
	1%	NP-40
	0,5%	Natriumdesoxycholat

Um unspezifische Bindungen zu beseitigen, wurden die Überstände (ca. 300 µl) der Zelllysate zunächst mit Protein A-Agarose (30 µl) vorinkubiert (1 h, 4°C, auf dem Schüttler). Nach dem Zentrifugieren (1 min 14000 rpm) wurden die Antikörper (1-3 µg anti-C2 oder anti-S4) zu den Überständen zugegeben und inkubiert (1 h, 4°C, auf dem Schüttler). Danach wurden zu dem Gemisch 60 µl Protein A-Agarose zugegeben und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nachdem dem Zentrifugieren (1 min 14000 rpm) wurden die Überstände vorsichtig mit einer Absaugpumpe entfernt. Anschließend wurde 1 ml IP-Puffer zugesetzt und 5 min bei 4°C geschüttelt. Diese Schritt wurde 5 mal wiederholt. Anschließend wurden 20 µl 1 x Proben-Puffer zugegeben und 5 min gekocht. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben auf die SDS-Gele aufgetragen und dann Western Blot mit dem anti-Flag Antikörper durchgeführt.

2.2.20 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Protein-Assay ist eine Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (1976). Zu 200 µl Probe wurden 800 µl Bio-Rad-Lösung zugegeben und gut durchmischt. Für die Erstellung einer Eichkurve wurden BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 2, 5, 10, 20 und 50 µg/ml vermessen. Die Messungen wurden in Einweg-Acryl-Küvetten bei einer Wellenlänge von 590 nm gegen Wasser durchführt. Die Differenz aus dem Messwert bei 590 nm wurde gegen die eingesetzte Proteinmenge der entsprechenden Eichlösung aufgetragen und die Proteinmenge der Probe anhand der Eichgeraden ermittelt.

2.2.21 Expression und Aufreinigung der GST-Fusionsproteine

Puffer 1: Tris-HCl pH 8,4, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2,5 mM

Puffer 2: Tris-HCl pH 7,5, NaCl 150 mM, MgCl₂ 2,5 mM

1. 300 ml LB-Amp plus 2% Glucose (die Zugabe von Glucose vermindert die basale Expression) wurden mit 3 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt.
2. Induktion wurde mit 1mM IPTG (End-Konzentration) für 1 h bei 30°C unter schwachen Schütteln inkubiert (100 rpm).
3. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4000 rpm, 15 min bei 4°C in der Sorvall-Zentrifuge geerntet (GS-3 Rotor).
4. Das Pellet wurde in 15-20 ml eiskaltem 1 x PBS resuspendiert und dann zweimal unter der French Press bei 800-1000 psi gepresst.
5. Nach Zentrifugation für 15 min bei 14000 rpm und 4°C in der Sorvall (SS-34 Rotor) wurde der Überstand in 80 mg Glutathion-Agarose (Agarose in 15 ml Bidest 2 h gequollen, anschließend in 1 x PBS äquilibriert) auf einer Säule überführt.
6. 3 x Zellaufschluß wurde auf die Säule geben und langsam mit 4 x Säulenvolumen 1 x PBS gewaschen, mit 2 x Säulenvolumen Puffer 1 äquilibriert und dann in 1,8 ml 1 x Thrombinpuffer mit 1 U (ca. 2 µl) Thrombin über Nacht bei leichtem Schütteln inkubiert.
7. Zur Sicherheit wurden nach dem Auslaufen des Thrombinpuffers 1,8 ml Puffer 2 auf die Säule gegeben, ca. 10 min bei 4°C auf geschüttelt und dann ausgelaufen.
8. Zur Bindung des biotinylierten Thrombins an Streptavidin-Agarose 30 min bei 4°C im Drehteller inkubiert. Pro Enzymeinheit wurden 20 µl 50%ige Streptavidin-Agarose zugegeben (*Capture*). Die Abtrennung der Streptavidin-Agarose erfolgte mit einem speziellen Filter (*Spin Filter „Thrombin-Cleavage-Capture-Kit*) durch Zentrifugation bei 1000 rpm 3 min lang.
9. Die Proteinbestimmung erfolgte, nachdem die Proben nach Bedarf konzentriert wurden. Danach erfolgte die Zugabe von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 20% und die Lagerung der Aliquots bei -70°C.
10. Die Regeneration der Glutathion-Agarose wurde mit 1 ml Glutathion-Elutionspuffer, 10 min bei RT durchgeführt (Drehinkubator). Danach erfolgte das Waschen mit 25 ml TBE + 0,5 M NaCl, anschließend mit Bidest, dann mit 0,1 M NaAc pH 4 + 0,5 M NaCl und danach nochmals mit Bidest. Die Lagerung erfolgte 1 M NaCl bei 4°C. Vor dem erneuten Gebrauch wurde mit 1x PBS aquilibriert.

2.2.22 Durchführung von Proteaseassays mit fluorogenen Substraten

Substratpuffer:	50 mM	Tris pH 7,5
	25 mM	KCl
	10 mM	NaCl
	1 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	EDTA
	1 mM	DTT, frisch zugesetzt

Stammlösung des Peptidsubstrats: 4 mM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in DMF gelöst

Die Assays wurden in der Regel in 100 µl Substratpuffer mit 0,1 µg 20S Proteasom und 100 µM Peptidsubstrat (Endkonzentration) durchgeführt. Es wurden schwarze 96-Lochplatten verwendet. Die Fluoreszenz der vom Substrat abgespaltenen Gruppe (AMC) wurde mit dem „Fluostar STL“ oder „Fluoroscen II“ (Labsystems) bei einer Exzitation von 390 nm und einer Emission von 460 nm bei RT oder bei 37°C gemessen. Der „Gain“ betrug 20, die Anzahl der „Blitze“ 10. Die Fluoreszenz

wurde in $\Delta F/\text{min}$ angegeben.

1. Titration ansteigender Mengen von Tat-Peptiden gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms.

0,1 μg 20S Proteasom wurden mit je 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,15625 und 0 $\mu\text{g/ml}$ der Tatpep1, Tatpep2, Tatpep3 und Tatpep4 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluoroscanner II“ (Labsystems) bei 37°C gemessen.

2. Titration ansteigender Mengen von Tat-Peptiden gegen eine konstante Menge des nativen 11S Regulators und des 20S Proteasoms.

0,1 μg 20S Proteasom und 0,16 μg nativer 11S Regulator wurden mit 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 und 0 $\mu\text{g/ml}$ Tatpeptide 1, 2, 3 und 4 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluoroscanner II“ (Labsystems) bei 37°C gemessen.

3. Titration ansteigender Mengen von REG α wt oder REG α m gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms.

0,1 μg 20S Proteasom wurden mit 120, 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 1,875 und 0 $\mu\text{g/ml}$ REG α wt oder REG α m 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

4. Titration ansteigender Mengen von REG α wt/REG β oder REG α m/REG β gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms.

0,1 μg 20S Proteasom wurden mit 20, 10, 05, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 und 0 $\mu\text{g/ml}$ REG α wt und REG β oder REG α m und REG β 60 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

5. Titration ansteigender Mengen von REG α wt gegen eine konstante Menge der REG α wt/REG β und des 20S Proteasoms.

0,1 μg 20S Proteasom und 0,3 μg REG α wt, 0,3 μg REG β wurden mit 30, 20, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 und 0 $\mu\text{g/ml}$ REG α wt 60 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

6. Titration ansteigender Mengen von REG α m gegen eine konstante Menge der REG α wt/REG β und des 20S Proteasoms.

0,1 μg 20S Proteasom und 0,3 μg REG α wt, 0,3 μg REG β wurden mit 30, 20, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 und 0 $\mu\text{g/ml}$ REG α m 60 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

7. Titration ansteigender Mengen der Tatpeptide gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms.

0,1 μg 20S Proteasom wurden mit 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,15625 und 0 $\mu\text{M/ml}$ Tatpeptide 1, 2 und 5 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

Die Daten wurden nach folgender Formel analysiert:

$$V = \frac{V_{\max 1} + V_{\max 2}[\text{Tat}]}{(K_1 + [\text{Tat}]) (K_2 + [\text{Tat}])}$$

Dabei wurden für das Tat-Protein und den 11S Regulator zwei Bindungsstellen am 20S Proteasom angenommen. Die Bedeutungen der kinetischen Konstanten $V_{\max 1}$, $V_{\max 2}$, K_1 und K_2 sind durch folgende Gleichungen erklärt:

$$V_{\max 1} = (K_1^{\text{Tat}} K_2^{\text{Tat}} / K_1^{\text{REG}} + K_2^{\text{REG}}) [\text{REG}]^2$$

$$V_{\max 2} = V_{\max} (K_1^{\text{Tat}} / K_1^{\text{REG}} + K_2^{\text{Tat}} / K_2^{\text{REG}}) [\text{REG}]$$

$$K_1 = K_1^{\text{Tat}} (1 + [\text{REG}] / K_1^{\text{REG}})$$

$$K_2 = K_2^{\text{Tat}} (1 + [\text{REG}] / K_2^{\text{REG}})$$

2.2.23 Dot-Blot

Entsprechend der Gebrauchsanweisung wurde die Nitrocellulose Membran in die Dot-Blot-Apparatur eingelegt. 1 µg 20S Proteasom (0,55 mg/ml) wurde auf jedes Loch gegeben. Nach 15 min wurde mit Waschpuffer (PBS-T, wie in 2.2.17) 5 min lang 3 mal gewaschen. Die Membran wurde mit Blockpuffer 2 h bei RT oder Übernacht bei 4°C blockiert. Die geschnittenen Membranstreifen wurden mit unterschiedlichen Proteinen ($\text{REG}\alpha$ und Tat Peptide) 2 h bei RT unter ständigem Schütteln inkubiert ($\text{REG}\alpha$ und die Tat-Peptiden wurden zuerst 30 min bei 37°C vorinkubiert). Nach dem Waschen (6 mal, je 5 min) wurde mit dem Anti- $\text{REG}\alpha$ Antikörper (1:10000) und weiterem Waschen (6 mal, je 5 min) mit dem zweiten Antikörper (1:10000) inkubiert. ECL erfolgte wie Gebrauchsanweisung.

2.2.24 Inkubation der Tat Peptide und des vollständiges Tat-Proteins mit B8 Zellen

Am ersten Tag wurden die B8 Zellen in 6-well-Platten (je ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well) verteilt. Am zweiten Tag wurden Tatpep1, Tatpep5, (je 2 µg/ml, Endkonzentration) und das rekombinante Tat-Protein (1,6 µg/ml, Endkonzentration) zu den B8 Zellen zugesetzt. Nach 24 h wurden die behandelten und die unbehandelten B8 Zellen (Kontrolle) geerntet. Nach der Zellzählung wurden gleiche Mengen der B8 Zellen zum CTL-Assay durchgeführt.

2.2.25 Herstellung stabiler Transfektanten von $\text{REG}\alpha_{\text{wt}}$ und $\text{REG}\alpha_{\text{m}}$

Lösungen:

1 mg/ml G418 (1 g G418 in 5 ml PBS + 5 ml 1 M HEPES, pH 7,7)

2 M CaCl_2

2 x HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM Glucose, 50 mM HEPES pH 7,05)

10 µg des Konstrukts pcDNA3.1 HisC REG α wt cDNA oder pcDNA3.1 HisC REG α m und 2 µg des pLXSP wurden mit dem 0,1 fachen Volumen 3 M NaAc (pH 5,1) und dem 2,5 fachen Volumen 99-100% Äthanol bei -70°C präzipitiert, danach mit 70% Äthanol gewaschen und in 440 µl sterilem bidest. H₂O aufgenommen. 500 µl 2 x HBS und 62 µl 2 M CaCl₂ wurden innerhalb von einer Minute zu dem Transfektionsansatz unter langsamem Schütteln zugesetzt und bei RT für 30 min inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann zu 1 x 10⁶ B8 Zellen pipettiert und 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Vollmedium gewechselt und die Zellen wurden für weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden 10⁴ Zellen/Well, 10³ Zellen/Well und 2 x 10² Zellen/Well in eine 96 Well-Mikrotiterplatte ausplattiert. Dieses Grenzverdünnungsverfahren wurde eingesetzt, um letztendlich eine Klonalität, das heißt, eine Zelle pro Well zu erreichen. Nach ca. zwei Tagen (70% konfluent gewachsene Zellen) wurden die B8 REG α wt - bzw. B8 REG α mt-Transfektanten mit Puromycin (2,5 µg/Well) versetzt. Die Klone, die das Puromycin-Resistenz-Gen enthielten, konnten unter diesen Bedingungen wachsen und wurden dann weiter unter Selektionsdruck kultiviert. Mittels Western Blot (mit dem anti-Xpress Antikörper) wurden die positiven Klone ausgewählt und eingefroren.

2.2.26 CTL-Messung

Dieser Test wurde durchgeführt, um die Antigenpräsentation der Zielzellen (Targetzellen) zu messen. Hierzu wurden die Targetzellen mit ⁵¹Chrom markiert und anschließend zusammen mit cytolytischen T-Lymphozyten (CTL) inkubiert. Da die CTL die Targetzellen lysieren, wenn sie ihr Antigen auf deren Oberfläche erkennen, ist die freigesetzte Radioaktivität im Überstand ein Maß für die spezifische Lyse.

2 x 10⁵ Targetzellen wurden 2 Stunden mit 20 µCi Na⁵¹CrO₄ markiert und anschließend dreimal mit Vollmedium gewaschen. Jeweils 5000 markierte Zellen wurden in einer Mikrotiterplatte (96 Well-Platte) zu den titrierten Effektorzellen (CTL) hinzugegeben. Um die räumliche Nähe von CTL und Targetzellen zu gewährleisten, wurde die Platte 2 min bei 200 x g zentrifugiert und anschließend für 4 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Kulturüberstand abgenommen und die freigesetzte Radioaktivität bestimmt. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität wurden die Targetzellen mit 1% Triton versetzt und die Radioaktivität ebenfalls in 100 µl bestimmt. Die Spontanlyse stellt die freigesetzte Radioaktivität (in 100 µl) in Abwesenheit der CTL dar. Die spezifische Lyse berechnet sich nach der Gleichung:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = \frac{\text{cpm (Probe)} - \text{cpm (Spontanlyse)}}{\text{cpm (Gesamtaktivität)} - \text{cpm (Spontanlyse)}} \times 100$$

2.2.27 Vergleich der Struktur des Tat-Proteins mit der von REG α

Mittels automatischer Superposition in DIP (*Dictionary of Interfaces in Proteins*) wurden die Strukturdaten des Tat-Proteins (PDB-code: TBC) und mit denen des REG α (PDB-code: AVO) verglichen (Preissner et al., 1998). Um die Ähnlichkeit zwischen dem Tat-Protein und dem REG α zu testen (Preissner et al., 1999), wurde die Struktur des Tat-Proteins in die Segmente zergliedert. Nur wenige sekundäre strukturelle Elemente konnten gefunden werden. Es wurden nur die zugänglichen Region des Tat-Proteins mit dem REG α verglichen. Die Struktur des humanen 20S Proteasoms wurde von Gille et al. übernommen (Gille et al., 2000).

3 Ergebnisse

3.1 Die Aminosäuren 37-72 des Tat-Proteins sind essentiell für die Bindung an die Proteasomen in HeLa Zellen

Vor 3 Jahren hat unsere Arbeitsgruppe gezeigt, dass das Tat-Protein an das 20S Proteasom und den 19S Regulator des 26S Proteasoms in vitro binden kann. In der vorliegenden Arbeit habe ich getestet, ob diese Bindung auch in vivo nachzuweisen ist. Die eukaryotischen Vektoren mit Flag-Tat cDNA oder mit der Flag- Δ Tat cDNA wurden in HeLa Zellen mittels Lipofektion (Lipid-Method) (ca. 3×10^7 HeLa Zellen, ca. 90 μ g Plasmid-cDNA) transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Überstände für die Immunpräzipitation verwendet.

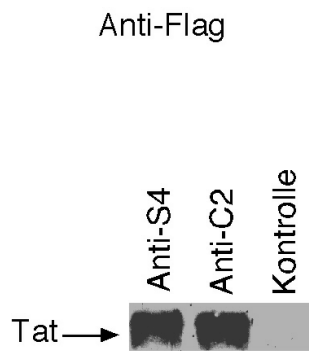
300 μ l des mit dem Flag-Tat transfizierten HeLa Zelllysats wurden bei jedem Versuch eingesetzt. Außerdem wurden 300 μ l Lysat von nicht-transfizierten HeLa Zellen als Kontrolle benutzt. 2 μ g anti-C2 Antikörper wurden zur Präzipitation des 20S Proteasoms verwendet und zunächst mit 300 μ l Lysat der transfizierten HeLa Zellen oder mit 300 μ l Lysat der nicht-transfizierten HeLa Zellen inkubiert. 2 μ l anti-S4 Antikörper wurden zur Präzipitation des 19S Regulators verwendet und ebenfalls mit 300 μ l Lysat der mit Flag-Tat transfizierten HeLa Zelllysate inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden im Western Blot mit dem anti-Flag Antikörper (1:2000) getestet. In der Abb. 3.1A ist eine deutliche Bande in der Immunpräzipitation zu sehen. Das Ergebnis zeigt, dass das exprimierte Tat-Protein sowohl an das 20S Proteasom als auch an den 19S Regulator des 26S Proteasoms in HeLa Zellen bindet. In den nicht-transfizierten (Kontrolle) HeLa Zellen ist keine Bande im Präzipitat zu sehen.

Die Bindung des Tat-Proteins an intrazelluläre Proteasomen wurde durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese bestätigt. 2 μ l Lysate der mit Flag-Tat oder Flag- Δ Tat transfizierten HeLa Zellen wurden auf Gradientengele (4-15% Acrylamid) aufgetragen, im Phast-System aufgetrennt und die Proteine auf Nitrocellulose geblottet. Im Western Blot wurde der anti-Flag Antikörper (1:2000) benutzt. In der Abb. 3.1B ist zu sehen, dass das exprimierte vollständige Tat-Protein mit dem 26S Proteasom und dem 20S Proteasom unter nativen Bedingungen co-migriert. Im Gegensatz dazu kann das exprimierte Fragment Δ Tat 37-72 nicht nachgewiesen werden und läuft vermutlich unter diesen Bedingungen aus dem Gradientengel aus.

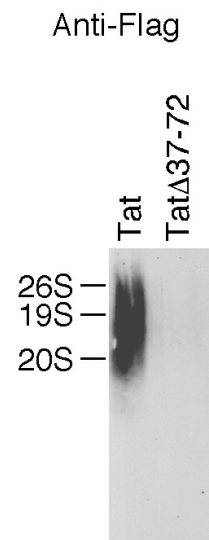
Ähnliche Resultate wurden mit der Dichtgradientenzentrifugation erzielt. 300 μ l Lysate von Flag-Tat oder Flag- Δ Tat transfizierten HeLa Zellen wurden auf 12 ml 10-40% Glyceringradienten vorsichtig aufgeladen. Nach dem Zentrifugieren wurden die Gradienten von oben nach unten in 18 Fraktionen (je 0,68 ml) aliquotiert und anschließend die Proteine der Fraktionen mit TCE präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen und über SDS-PAGE getrennt. Im anschließenden Western Blot wurde der anti-Flag Antikörper verwendet. In der Abb. 3.1C ist gezeigt, dass die Verteilung des exprimierten vollständigen Tat-Proteins der Verteilung des 26S Proteasoms und des 20S Proteasoms in dem 10-40% Glyceringradienten entspricht. Im Gegensatz dazu liegt das exprimierte Tat-Fragment (Tat Δ 37-72-Protein) in den Fraktionen mit geringer Dichte vor.

Die Experimente demonstrieren, dass das exprimierte Tat-Protein an das endogene 20S Proteasom und das 26S Proteasom bindet. Die Bindungsstelle des Tat-Proteins befindet sich zwischen den Aminosäuren 37-72.

A Immunpräzipitation



B Nicht-denaturierendes Gel



C Western Blot mit Glyceringradienten

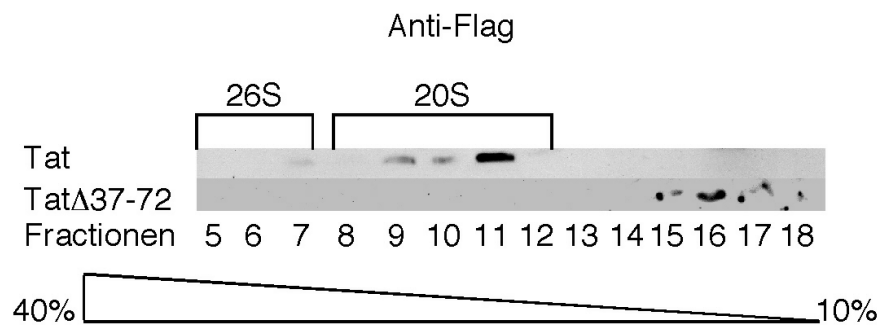


Abb. 3.1: Die Aminosäuren 37-72 von dem Tat-Protein sind essentiell für die Bindung an die Proteasomen in HeLa Zellen. A, Immunpräzipitation: Die Vektoren pcDNA3 mit der Flag-Tat cDNA oder mit der Flag- Δ Tat cDNA wurden in HeLa Zellen transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Überstände für die Immunpräzipitation verwendet. Der anti-C2 Antikörper wurde zur Präzipitation des 20S Proteasoms und der anti-S4 Antikörper zur Präzipitation des 19S Regulators (oder 26S Proteasom) verwendet. Das Lysat der nicht-transfizierten HeLa Zellen wurde mit dem anti-C2 Antikörper als Kontrolle präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im Western Blot mit dem anti-Flag Antikörper getestet. B, Nicht-denaturierende Gelelektrophorese: Die Lysate (wie in A) wurden auf die nicht-denaturierende Gelelektrophorese aufgetragen und im Phast-System aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose geblottet. Im Western Blot wurde der anti-Flag Antikörper benutzt. Die Positionen des 26S Proteasoms (26S), des 19S Regulator (19S) und des 20S Proteasoms wurden im gleichen Blot mit dem anti-S4 Antikörper und dem anti-C2 Antikörper identifiziert. C, Western Blot mit Fraktionen von Glyceringradienten: Die Lysate (wie in A) wurden auf 10-40% Glyceringradienten aufgeladen. Nach dem Zentrifugieren wurden die Gradienten von oben nach unten in 18 Fraktionen (je 0,68 ml) aliquotiert. Die Proteinpräzipitate (TCE-Fällung) wurden im Western Blot mit dem anti-Flag Antikörper getestet.

3.2 Die basische Domäne des Tat-Proteins spielt bei der Inhibition des 20S Proteasoms eine entscheidende Rolle

Um die Wirkung der Tat-Region 37-72 auf das Proteasom besser untersuchen zu können, wurde ein Tat-Peptid 37-72 synthetisiert (Tatpep1). Außerdem wurden veränderte Versionen von Tatpep1

3.3 Das Tat-Peptid 37-72 konkurriert mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom

In früheren Experimenten hatten wir beobachtet, dass das Tat-Protein mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom konkurriert. Aus diesem Grund wurden die Tat-Peptide 1-4 mit dem 20S Proteasom (je 0,1 μg) und dem isolierten humanen 11S Regulator (je 0,16 μg) 30 min bei 37°C vorinkubiert und dann das fluorogene Substrat zugegeben. In diesen Experimenten war das Verhältnis des 20S Proteasoms zum 11S Regulator ungefähr 1:6. Der 20S Proteasom-11S Regulator Komplex hat unter diesen Bedingungen etwa 50% seiner maximalen Aktivität. Die basale 20S Proteasomaktivität wurde etwa 20-fach stimuliert. Die Abb. 3.3 zeigt, dass das Wildtyp Tat-Peptid 37-72 (Tatpep1) mit dem 11S Regulator konkurriert. Die Peptide Tatpep2, Tatpep3 und Tatpep4 sind nicht in der Lage, effektiv mit dem 11S Regulator zu konkurrieren.

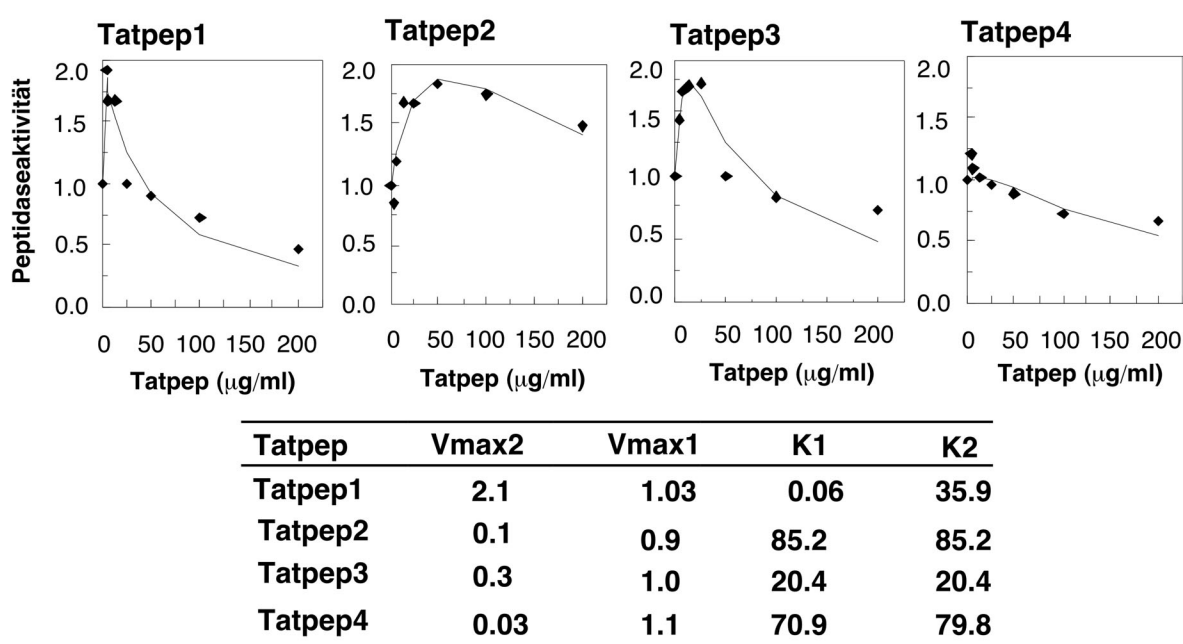


Abb. 3.3: Das Tat-Peptid 37-72 konkurriert mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom. Ansteigende Mengen der Tat-Peptide Tatpep1, 2, 3 und 4 wurden gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms und des isolierten 11S Regulators (Molares Verhältnis des 20S Proteasoms und des 11S Regulator = 1 : 6) in Anwesenheit von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA titriert. Die Aktivität wurde als ΔF (F = Fluoreszenz) pro min bestimmt und als relative Aktivität (1.0 = 20-fache Baseline-Aktivität mit dem 20S Proteasom alleine) ausgedrückt. Die Punkte sind experimentelle Daten. Die Kurven wurden mittels eines Modells mit zwei Bindungsstellen des Tat-Proteins am 20S Proteasom berechnet (siehe 2.2.22). Die berechneten kinetischen Konstanten Vmax, K1 und K2 für die Tat-Peptide Tatpep1, 2, 3 und 4 sind in der Tabelle zusammengefasst. Die Experimente wurden viermal unabhängig wiederholt.

3.4 Identifizierung einer gemeinsamen Struktur im Tat-Protein und in der 11S Regulator α -Untereinheit (REG α)

Da es keine Ähnlichkeit zwischen dem Tat-Protein und dem REG α bei einem einfachen Sequenzvergleich gibt, haben wir die räumliche Struktur des Tat-Proteins und die des REG α verglichen (Kooperation mit Dr. R. Preissner, Institut für Biochemie).

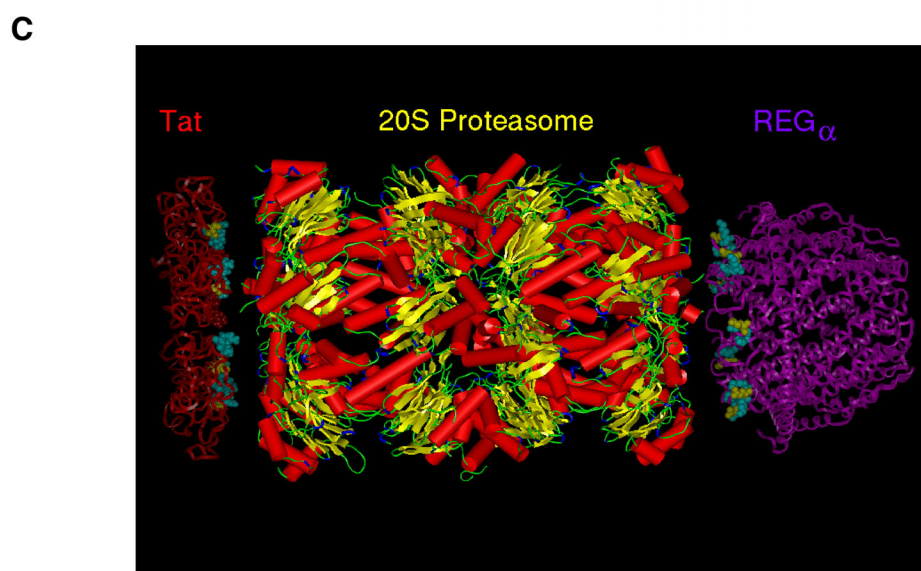
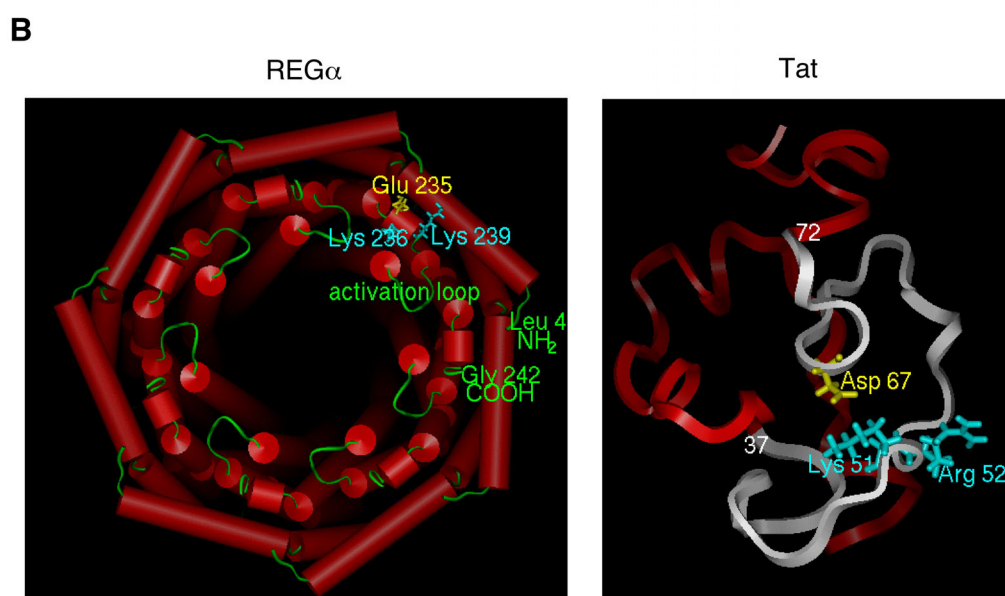
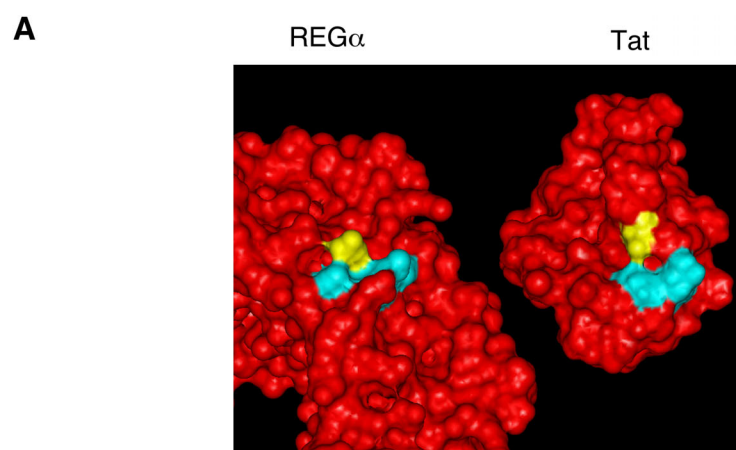


Abb. 3.4: Identifizierung einer gemeinsamen Struktur im Tat-Protein und in der 11S Regulator α -Untereinheit (REG α). A, Darstellung der identifizierten Struktur im Tat-Protein und in REG α . Die an den Oberflächen befindlichen Reste Lys236 und Lys239 von REG α und Lys51 und Arg52 des Tat-Proteins sind mit hellem Blau und die Aminosäuren Glu235 (REG α) und Asp67 (Tat-Protein) mit Gelb gekennzeichnet. B, Die heptamere Struktur von REG α wurde durch rote Zylinder (α -Helix) und grüne Bänder (Schleifenregion) dargestellt. Für eine der sieben Untereinheiten wurden N und C Termini und die Aktivierungsdomäne gekennzeichnet. Die gekennzeichneten drei Reste (Glu235, Lys236 und Lys239) sind Teil einer kurzen α -Helix, die sich in der Nähe des C Terminus befindet. Das Rückrad des Tat-Proteins wurde durch ein rotes Band dargestellt, welches in der Region der Aminosäuren 37 bis 72 weiß ist. C, Darstellung des humanen 20S Proteasoms mit seiner sekundären Struktur (rote Zylinder: α -Helix; Gelbe Pfeile: β -Sheets; grüne Bänder: Schleifen). Die Hauptkette des heptameren REG α wurde durch ein violettes Band dargestellt. Die Reste 235, 236 und 239 sind gekennzeichnet. Es wurde eine heptamere Ringstruktur aus 7 Tat-Molekülen konstruiert. Die gekennzeichneten Reste 51, 52 und 67 liegen in ähnlicher Position zum 20S Proteasom wie die des REG α .

Unsere Daten zeigen, dass eine ähnliche Struktur in beiden Proteinen vorliegt. Diese Struktur wird durch die Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 des Tat-Proteins und die Aminosäuren Glu235, Lys236 und Lys239 von REG α gebildet. Die Struktur ist auf der Oberfläche von beiden Proteinen lokalisiert (Abb. 3.4A) und bildet eine geladene α -Helix in REG α (Abb. 3.4B). Ausgehend von der Struktur des PA26-20S Komplexes (*Whitby et al., 2000*) und der humanen REG α -Struktur wurde die Bindung des REG α Heptamers an den humanen 20S Proteasom α -Ring simuliert (Abb. 3.4C). Das Modell zeigt deutlich, dass die identifizierte Struktur des REG α an den 20S Proteasom α -Ring im 11S-20S Komplex bindet. Darüber hinaus wurde ein heptamerer Ring bestehend aus 7 Tat-Molekülen konstruiert. Die identische Struktur des Tat-Proteins liegt in ähnlicher Position zum 20S Proteasom wie die des REG α .

3.5 Herstellung des rekombinanten REG α wt, REG α m und REG β

Um die Rolle der identifizierten Struktur im 11S Regulator eingehend zu studieren, wurden die Aminosäuren Glu235 und Lys236 durch Ala mittels *Site-directed Mutagenesis* substituiert. Die rekombinanten Proteine wurden als GST-Fusionsproteine exprimiert und aufgereinigt. Der GST-Anteil des Fusionsproteins bindet hochspezifisch an die Glutathion-Agarose, wodurch das Protein in einem einzigen Affinitäts-chromatographischen Schritt mit einem Reinheitsgrad von bis zu 90% isoliert werden konnte. Die Thrombinschnittstelle zwischen GST und dem gewünschten Protein ermöglichte die Abspaltung und Abtrennung des GST-Anteils durch Verdau des Fusionsproteins im Glutathion-Agarose-gebundenen Zustand. Die in den nachfolgenden Versuchen eingesetzten rekombinanten Proteine REG α wt, REG α m und REG β wurden auf diese Weise präpariert. Weil geringe Mengen an Thrombin einen Einfluss auf die Aktivität des 20S Proteasoms haben könnten, wurde Streptavidin-Agarose zugegeben, um das biotinylierte Thrombin zu entfernen.

Die aufgereinigten REG α wt, REG α m und REG β wurden in der SDS-PAGE getestet (Abb. 3.5A). Die Reinheit der Thrombin-verdauten rekombinanten Proteine beträgt etwa 95% (Daten nicht gezeigt). Die aufgereinigten Proteine haben die richtige Größe (ca. 30 kD) und mittels Immunoblot wurde die Identität der Proteine nachgewiesen (Abb. 3.5B).

A

B

SDS-PAGE

Western Blot

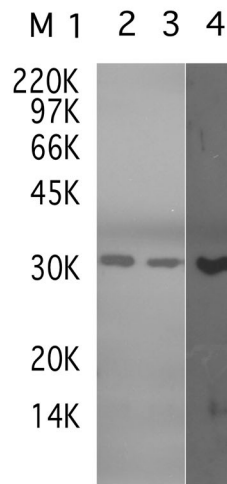
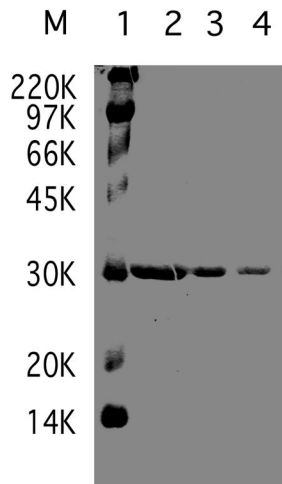


Abb. 3.5: Herstellung der rekombinanten REG α wt, REG α m und REG β Proteine. A, Coomassiegefärbte SDS-Gele nach Proteinaufreinigung: 1) Molekulargewichtsmarker; 2) Thrombinverdautes, rekombinantes REG α wt; 3) Thrombinverdautes, rekombinantes REG α m; 4) Thrombinverdautes, rekombinantes REG β . B, Western Blot: 1) bis 4) sind wie in Abb. 3.5A. 2 und 3 wurden mit dem anti- REG α Antikörper inkubiert. 4 wurde mit dem anti- REG β Antikörper inkubiert.

3.6 Messung der Chymotrypsin-ähnlichen 20S Proteasom-Aktivität in Anwesenheit von REG α wt, REG α m mit oder ohne REG β in vitro

In den folgenden Experimenten wurden 0,1 μ g 20S Proteasom und 100 μ M Peptidsubstrat (Endkonzentration) eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde bei RT gemessen. Im ersten Schritt wurden ansteigende Mengen der rekombinanten REG α wt oder REG α m Proteine gegen konstante Mengen des 20S Proteasoms titriert. Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität ist abhängig von der eingesetzten Menge an REG α wt (Abb. 3.6A). REG α m war nicht in der Lage, das 20S Proteasom zu stimulieren. Nun wurden ansteigende Mengen der Kombinationen aus den rekombinanten REG α wt + REG β oder REG α m + REG β gegen konstante Mengen des 20S Proteasoms titriert. Die Daten zeigen (Abb. 3.6B), dass die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität abhängig von der eingesetzten Menge an REG α wt + REG β ist. Die Kombination von REG α m + REG β zeigt dagegen keine Stimulierung.

Es wurden ansteigende Mengen des rekombinanten REG α wt gegen konstante Mengen der rekombinanten REG α wt + REG β und konstante Mengen des 20S Proteasoms titriert. Zu konstanten Mengen an REG α wt (0,3 μ g) und REG β (0,3 μ g) wurden ansteigende Mengen von REG α wt eingesetzt. Dabei wurde eine Stimulierung bei niedrigen Konzentrationen beobachtet. Die Bindungsstellen des 11S Regulators am 20 S Proteasom sind unter diesen Bedingungen nicht gesättigt. Daher wird wahrscheinlich die Aktivität des 20S Proteasoms bis zu einem Optimum

stimuliert. Dann führen ansteigende $\text{REG}\alpha_{\text{wt}}$ Konzentrationen zur Konkurrenz mit dem $\text{REG}\alpha_{\text{wt}} + \text{REG}\beta$ Komplex um die Bindungsstelle am 20S Proteasom. Das führt zur Hemmung der Peptidaseaktivität (siehe Abb. 3.6C). Danach erfolgte die Titration mit ansteigenden Mengen von $\text{REG}\alpha_{\text{m}}$ gegen konstante Mengen der rekombinanten $\text{REG}\alpha_{\text{wt}} + \text{REG}\beta$ und konstante Mengen des 20S Proteasoms. Unter diesen Bedingungen kam es zu einer Hemmung (siehe Abb. 3.6D). Diese Daten könnten so interpretiert werden, dass die mutierte $\text{REG}\alpha_{\text{m}}$ Untereinheit zwar noch an das 20S Proteasom bindet und den 11S Regulator verdrängt, aber nicht mehr in der Lage ist, das 20S Proteasom zu stimulieren.

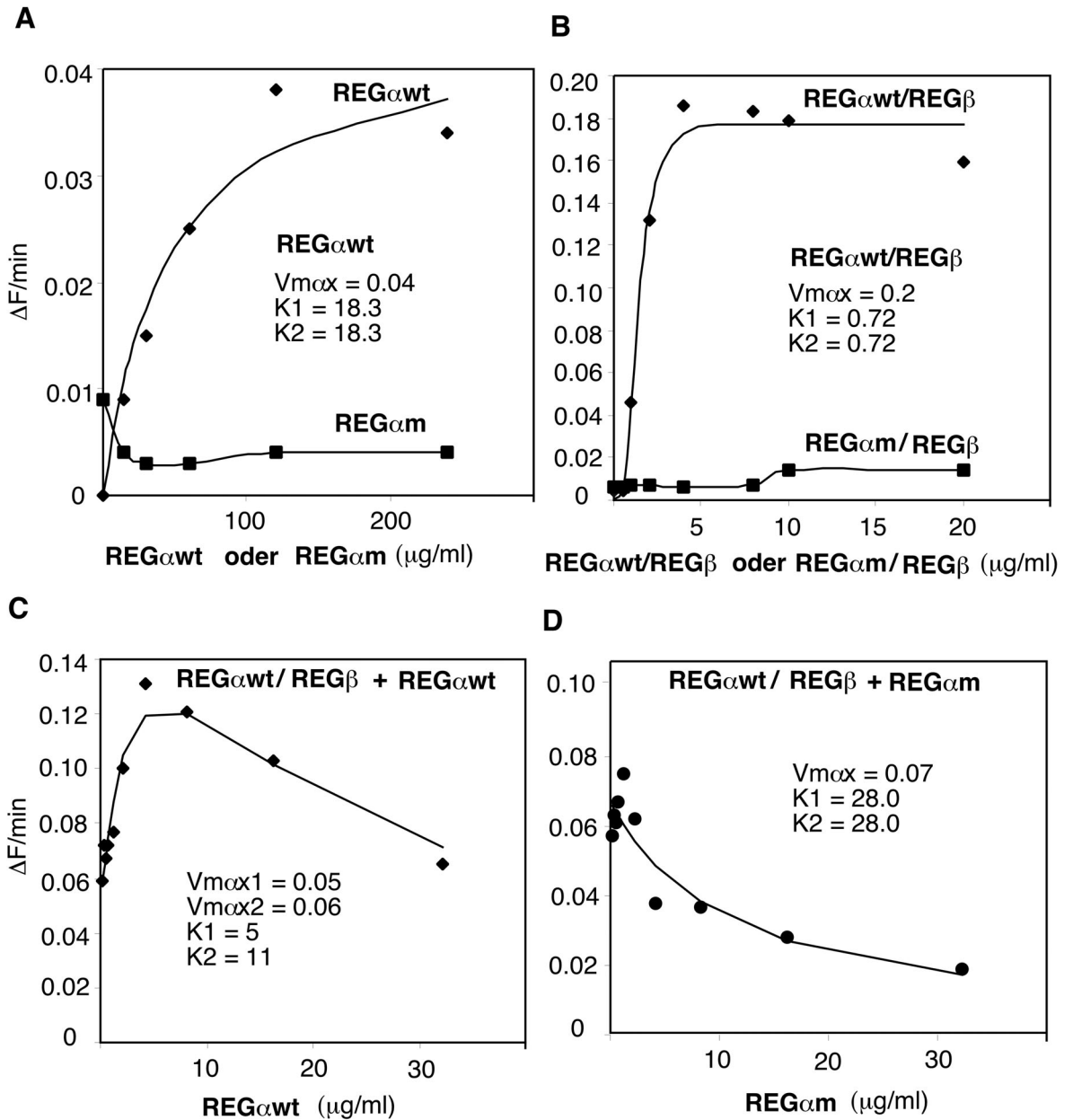


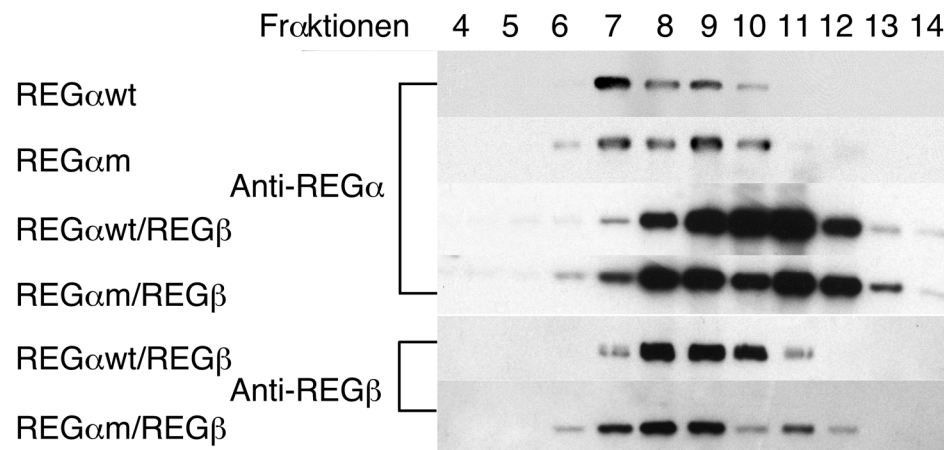
Abb. 3.6: Messung der Chymotrypsin-ähnlichen 20S Proteasom-Aktivität in Anwesenheit von REG α wt, REG α m mit oder ohne REG β in vitro. A, Ansteigende Mengen der rekombinanten REG α wt oder REG α m Proteine wurden gegen konstante Mengen des 20S Proteasoms in Anwesenheit von Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA titriert. Die Fluoreszenz wurde bei RT gemessen. Die Kurve und die kinetischen Konstanten wurden mit dem gleichen Modell wie in Abb. 3.2B berechnet. B, Ansteigende Mengen der Kombinationen aus den rekombinanten REG α wt + REG β oder REG α m + REG β wurden gegen konstante Mengen des 20S Proteasoms titriert. Die Fluoreszenz wurde wie in A gemessen und berechnet. C, Ansteigende Mengen der rekombinanten REG α wt wurden gegen konstante Menge der rekombinanten REG α wt + REG β und konstante Mengen des 20S Proteasoms titriert. Die Fluoreszenz wurde wie in A gemessen und berechnet. D, Ansteigende Mengen von REG α m wurden gegen konstante Mengen der rekombinanten REG α wt + REG β und konstante Mengen des 20S Proteasoms titriert. Die Fluoreszenz wurde wie in A gemessen und berechnet.

3.7 Die Mutation der rekombinanten REG α -Untereinheit hat keinen Einfluss auf die Komplexbildung mit sich selbst oder mit dem REG β oder mit dem 20S Proteasom

Für die 11S Regulator α -Untereinheit wurden eine Bindungsstelle (Aminosäuren 240-249) und eine Aktivierungsstelle (Aminosäuren 141-149) für das 20S Proteasom beschrieben. Es ergab sich nun die Frage, warum REG α m seine Aktivität verloren hatte. Wenn REG α m die Aktivierung des 20S Proteasoms, also das Gating, verhindert, muß die Mutante in der Lage sein Komplexe mit sich selbst, mit REG β und mit dem 20S Proteasom zu bilden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Verteilung von REG α m (24 μ g) und REG α wt (24 μ g) in den Fraktionen von 10-40% Glyceringradierten verglichen. Darüber hinaus wurden die Kombinationen aus rekombinantem REG α wt (12 μ g) oder REG α m (12 μ g) mit dem REG β (12 μ g) verglichen. Nach dem Glyceringradienten (12 ml) wurden die Proben in 14 Fraktionen (ca. 800 μ l) aufgeteilt und im Western Blot mit dem anti-REG α Antikörper oder mit dem anti-REG β Antikörper getestet. Es wurde nachgewiesen (Abb. 3.7A), dass die Verteilung des mutierten REG α m Untereinheit sehr ähnlich der von REG α wt ist. Das heißt, dass das REG α m heptamere Komplexe bilden kann wie REG α wt. Darüber hinaus war auch die Verteilung der Kombination aus REG α m + REG β gleich wie die der REG α wt + REG β . Das heißt, dass REG α m hexamere oder heptamere Komplexe mit REG β bilden kann.

Interessant war auch die Frage, ob REG α m an das 20S Proteasom binden kann. Dazu wurden REG α m (12 μ g) + REG β (12 μ g) oder REGwt (12 μ g) + REG β (12 μ g) mit dem 20S Proteasom 30 min bei 37°C vorinkubiert. Das molare Verhältnis vom 11S Regulator zum 20S Proteasom war 3 : 2. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben in 18 Fraktionen (ca. 680 μ l) aufgeteilt. Für die Western Blot Analyse wurden der anti-C2 (20S Proteasom) Antikörper und anti-REG β Antikörper verwendet. Die Experimente ergaben eine identische Verteilung des 20S Proteasoms in 4 Experimenten (Abb. 3.7B). Darüber hinaus ergab sich eine nahezu identische Verteilung der Kombination aus REG α m + REG β und der Kombination aus REG α wt + REG β . Daraus schlussfolgerten wir, dass die Mutante REG α m keinen Einfluss auf die Bindung des 11S Regulators an das 20S Proteasom hat. Um die Wechselwirkung von REG α m alleine mit dem Proteasom zu untersuchen, wurden Dot-Blots durchgeführt. Die Ergebnisse der Abb. 3.8C zeigen, dass auch REG α m alleine die Fähigkeit besitzt, an das 20S Proteasom zu binden.

A



B

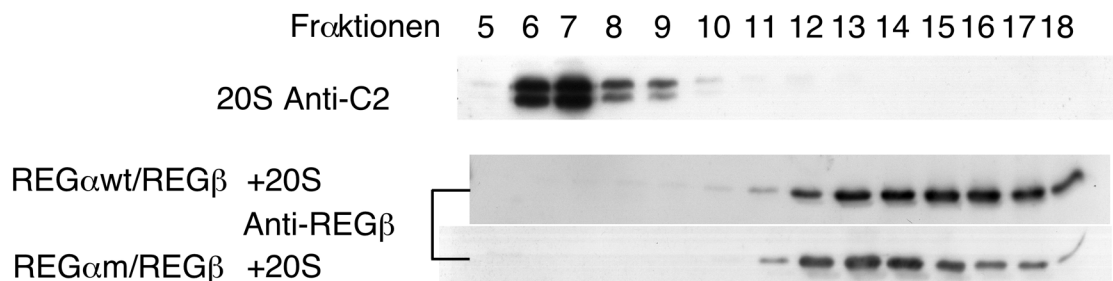


Abb. 3.7: Die Mutation der rekombinanten $REG\alpha$ Untereinheit hat keinen Einfluss auf die Komplexbildung mit sich selbst oder mit dem $REG\beta$ oder mit dem 20S Proteasom. A, Die Komplexbildung des $REG\alpha$ mit sich selbst oder mit dem $REG\beta$. Die Verteilungen von $REG\alpha_{wt}$, $REG\alpha_m$, $REG\alpha_{wt} + REG\beta$ und $REG\alpha_m + REG\beta$ wurden in den Fraktionen von 10-40% Glyceringradienten verglichen. Die Gradienten wurden in 14 Fraktionen (ca. 800 μ l) aliquotiert und im Western Blot mit dem Anti- $REG\alpha$ Antikörper oder mit dem Anti- $REG\beta$ Antikörper getestet. B, Komplexbildung des REG mit dem 20S Proteasom. Die Verteilungen von $REG\alpha_{wt} + REG\beta$ und $REG\alpha_m + REG\beta$ wurden mit der des 20S Proteasoms in den Fraktionen von 10-40% Glyceringradienten verglichen. Die Gradienten wurden in 18 Fraktionen (ca. 680 μ l) aufgeteilt und im Western Blot mit dem Anti-C2 (Identifizierung der Position des 20S Proteasoms) oder mit dem Anti- $REG\beta$ Antikörper getestet.

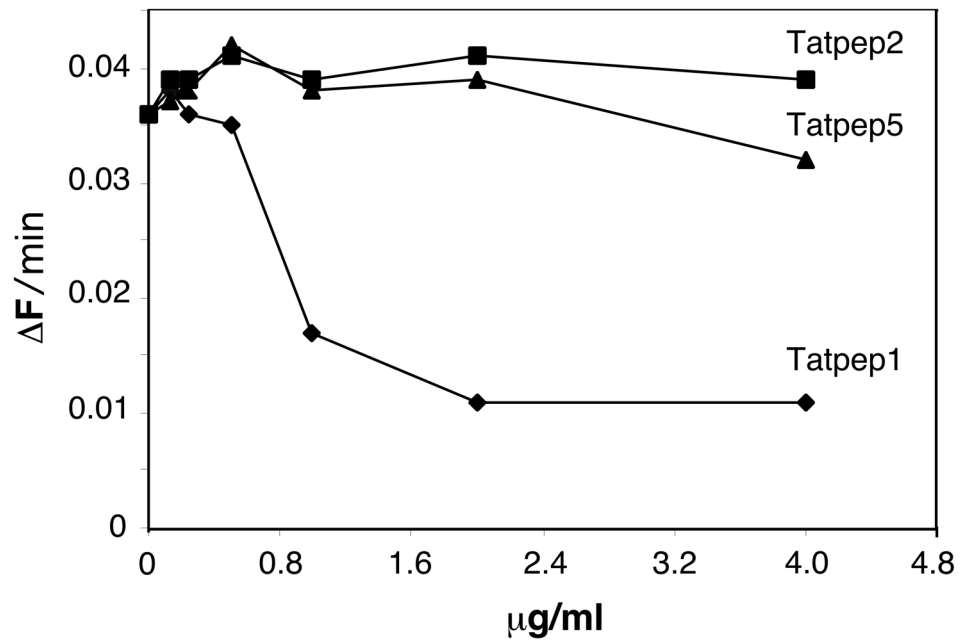
3.8 Die Mutation des Tat-Peptides 37-72 (Tatpep1) in den Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 (Tatpep5) verhindert die Konkurrenz mit dem 11S Regulator

Wie oben gezeigt wurde, gibt es eine gemeinsame Struktur zwischen $REG\alpha$ und dem Tat-Protein. Diese Struktur wird im Tat-Protein durch die Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 gebildet. Um diese Struktur eingehend zu studieren, wurde das Tatpep5 (Abb. 3.8A) synthetisiert. Das Tatpep5 besteht aus den Aminosäuren 37 bis 72 und die Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 wurden durch Ala substituiert. Tatpep1, Tatpep2 und Tatpep5 wurden mit dem isolierten 20S Proteasom und dem Peptidsubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC inkubiert (Abb. 3.8B). Die Daten zeigen, dass das Tatpep5 die Aktivität des 20S Proteasoms ähnlich wie das Tatpep2 nicht hemmen konnte. Das bedeutet, dass die Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 des Tat-Proteins für die Hemmung des 20S Proteasoms eine entscheidende Rolle spielen.

A Tatpep5

37 5152 67 72
CFITKGLGIS YGRKAARQRR RPSQGGQTHQ AIPKQ

B Peptidase Aktivität



C Dot-Blot

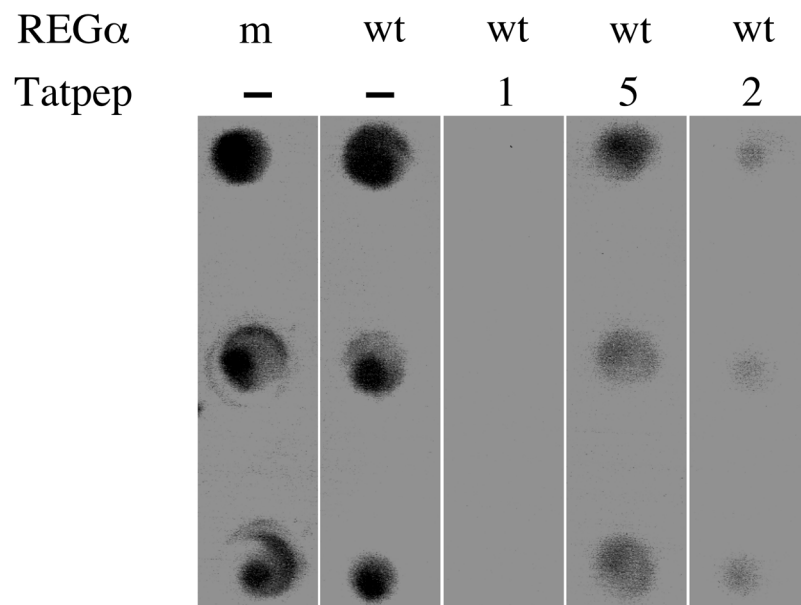


Abb. 3.8: Die Mutation des Tat-Peptides 37-72 (Tatpep1) der Aminosäuren Lys51, Arg52, und Asp67 (Tatpep5) verhindert die Konkurrenz mit dem 11S Regulator. A, Die Sequenz des Tatpep5. Die Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 wurden durch Ala substituiert. B, Messung der Chymotrypsin-ähnlichen 20S Proteasom-Aktivität. Tatpep1, Tatpep2 und Tatpep5 wurden mit dem 20S Proteasom und dem Peptidsubstrat Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC inkubiert. Die Fluoreszenz wurde bei RT gemessen. Die Peptidaseaktivität wurde als ΔF (F = Fluoreszenz) pro min ausgedrückt. C, Die Dot-Blots. Das 20S Proteasom wurde auf Nitrocellulose-Membranen aufgetragen. Danach wurden Nitrocellulose-Streifen mit je drei Proteasom-Dots mit REG α wt oder REG α m mit oder ohne Tatpep1, 2, 5 inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem anti-REG α Antikörper.

Um die Konkurrenz mit dem 11S Regulator zu untersuchen, wurden Dot-Blots durchgeführt. In diesen Experimenten wurde 1 μ g 20S Proteasom auf die Nitrocellulose-Membranen aufgetragen. Nach dem Blockieren wurden Nitrocellulose-Streifen mit je drei Proteasom-Dots mit REG α wt oder REG α m mit oder ohne Tatpep1, 2 und 5 inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem anti-REG α Antikörper. Es wurde nachgewiesen (Abb. 3.8C), dass Tatpep1 in der Lage ist, mit dem REG α wt zu konkurrieren. Sowohl Tatpep2 als auch Tatpep5 haben ihre Fähigkeit, den 11S Regulator vom 20S Proteasom zu verdrängen, verloren.

3.9 Der Einfluss des Tat-Proteins und der Tat-Peptide (Tatpep1 und Tatpep5) auf die Antigenpräsentation in vivo

Die synthetisierten Tat-Peptide Tatpep1 und Tatpep5 und das rekombinante 86 AA Tat-Protein wurden mit B8 Zellen inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen gesammelt und im CTL-Assay gemessen. In diesem Testansatz wurde mit Hilfe von cytolytischen T-Lymphozyten (CTL), die ein spezifisches pp89 Epitop erkennen, die Lyse der B8 Zellen durch die CTLs gemessen. Das Ausmaß der Zellyse ist proportional zur Menge des präsentierten pp89 Epitops. Es wurde gezeigt, dass das Tatpep1 die Antigenpräsentation hemmt. Das heißt, in Anwesenheit von Tatpep1 wird eine geringere Menge an pp89 Epitop auf der Zelloberfläche im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-B8 Zellen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu hat das Tatpep5 keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation (Abb. 3.9A). Daraus wurde geschlossen, dass die Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 bei der Hemmung der Antigenpräsentation durch das Tat-Protein eine entscheidende Rolle spielen. Nach der Inkubation der B8 Zellen mit dem vollständigen Tat-Protein konnte ebenfalls eine verminderte Präsentation des pp89 Epitops im CTL-Assay beobachtet werden (Abb. 3.9B).

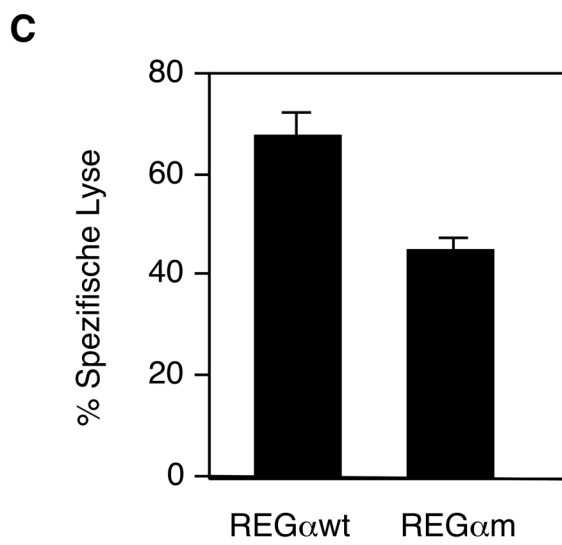
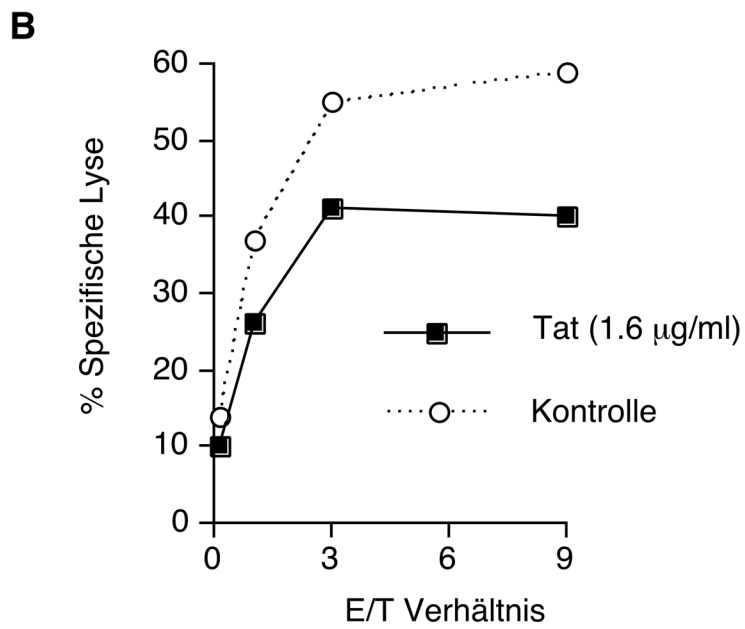
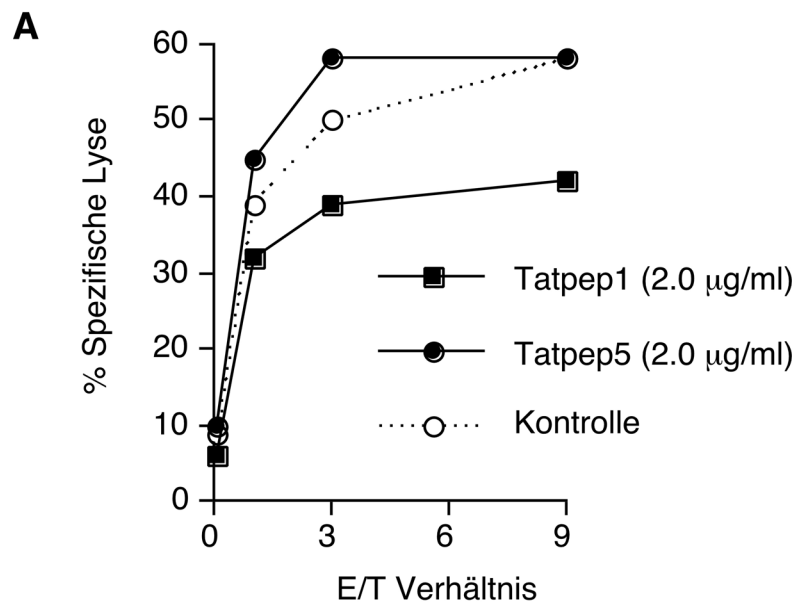


Abb. 3.9: Der Einfluss des vollständigen Tat-Proteins, der Tat-Peptide (Tatpep1 und Tatpep5) und der stabilen Transfektanten (REG α wt und REG α m) auf die Antigenpräsentation in vivo. A, CTL-Assay mit den Tat-Peptiden. Die Tat-Peptide Tatpep1 und Tatpep5 wurden mit B8 Zellen inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen im CTL-Assay gemessen. Die spezifische Lyse wurde mittels eines Modells (siehe 2.2.26) berechnet. B, CTL-Assay mit dem Tat-Protein. Das vollständige Tat-Protein wurde mit B8 Zellen inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen im CTL-Assay gemessen. Die spezifische Lyse wurde mittels eines Modells (siehe 2.2.26) berechnet. C, CTL-Assay mit den stabilen Transfektanten REG α wt und REG α m. Gleiche Mengen der drei REG α wt-exprimierenden und fünf REG α m-exprimierenden Zellklone wurden gesammelt und im CTL-Assay getestet. Die spezifische Lyse wurde mittels eines Modells (siehe 2.2.26) berechnet.

3.10 Herstellungen stabiler Transfektanten mit REG α wt und REG α m und deren Rolle bei der Antigenpräsentation

Die Vektoren HisC-REG α wt oder HisC-REG α m wurden in B8 Zellen mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Die Klone wurden mittels Western Blot mit dem Anti-Xpress Antikörper selektiert. Es wurden drei REG α wt-exprimierende und fünf REG α m-exprimierende Zellklone identifiziert. Gleiche Mengen dieser Zelle wurden gesammelt und im CTL-Assay getestet. Es konnte gezeigt werden (Abb. 3.9C), dass die drei REG α wt-exprimierenden Zelllinien die Antigenpräsentation des pp89 Epitops im Vergleich zu den Kontrollzellen verstärken (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu haben B8 Zellen, die REG α m stabil exprimieren, eine reduzierte Antigenpräsentation. Das heißt, dass die Aminosäuren Glu235 und Lys236 für die 11S Regulator-vermittelte 20S Proteasom-abhängige Antigenpräsentation von entscheidender Bedeutung sind.

3.11 Der Einfluss des Tat-Proteins auf die Stabilität der Transkriptionsregulatoren I κ B α und c-Jun in vivo

Die Vektoren, die für Flag-Tat und Flag- Δ Tat37-72 kodieren, wurden in ca. 1×10^6 HeLa Zellen mittels beschriebener Lipofektion transfiziert. Ca. 1×10^6 nicht-transfizierter HeLa Zellen dienen als Kontrolle. 4 h vor der Lyse wurden 20 μ M Lactacystin zu den HeLa Zellen gegeben. Lactacystin wurde als spezifischer Hemmstoff des 20S Proteasoms eingesetzt. Nach der Lyse und dem Zentrifugieren wurde die Proteinmenge der Überstände mit dem Photometer bei der OD 280 nm abgeschätzt. Gleiche Mengen der Überstände (ca. 20 μ g Protein) wurden auf die SDS-Gele aufgeladen. Im anschließenden Western Blot wurden der anti-I κ B α (1:1000) oder der anti-c-Jun (1:1000) Antikörper benutzt. Der verstärkte Abbau von I κ B α könnte bedeuten, dass NF- κ B freigesetzt wird. In der Abb. 3.10 ist zu sehen, dass das Tat-Protein zu einer Senkung des I κ B α -Spiegels und der c-Jun Konzentration in HeLa Zellen führt. Da die Abnahme sowohl von I κ B α als auch von c-Jun durch Lactacystin hemmbar ist, kann sie auf eine Stimulierung der Aktivität des 26S Proteasoms zurückgeführt werden. Im Gegensatz dazu zeigt das Tat-Fragment (Tat Δ 37-72) keinen Einfluss auf die Stabilität von I κ B α und c-Jun.

Tat1-86	+	-	-	+	-	-
Δ Tat37-72	-	+	-	-	+	-
Kontrolle	-	-	+	-	-	+
Lactacystin	-	-	-	+	+	+

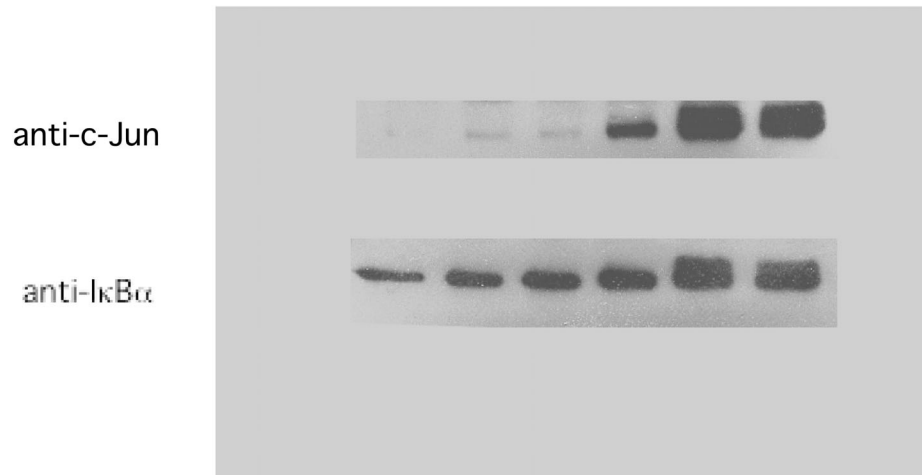


Abb. 3.10: Der Einfluss des Tat-Proteins auf die Stabilität der Transkriptionsregulatoren $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und c-Jun in vivo. 4 h vor der Lyse wurde 20 μM Lactacystin zu den Zellen gegeben. Nicht-transfizierte HeLa Zellen dienten als Kontrolle. Die Proteinmengen der Überstände der Lysate (wie in Abb. 3.1A) wurden mit dem Photometer bei OD 280 nm abgeschätzt. Gleiche Mengen der Überstände wurden auf die SDS-Gele aufgeladen. Im Western Blot wurden der anti-I κ B oder anti-c-Jun Antikörper benutzt.

4 Diskussion

4.1 Der Effekt des Tat-Proteins auf das 20S Proteasom in vitro und in vivo

Die präsentierten Daten bestätigen frühere Ergebnisse (Seeger *et al.*, 1997), die zeigten, dass das Tat-Protein an das 20S Proteasom in vitro binden kann. Auch andere virale Proteine wie z. B. E1A (*Adenovirus early region 1 a protein*) können an das 20S Proteasom binden und die Aktivität des 20S-11S-Komplexes hemmen (Grand *et al.*, 1999). Darüber hinaus binden die viralen Proteine HBX (*Hepatitis B Virus X Protein*) (Hu *et al.*, 1999) und TAX (*Human T-Cell Leukaemia Virus Transactivator*) (Rousset, *et al.*, 1996) an das 20S Proteasom. HBX kann die Peptidaseaktivität des 20S Proteasoms hemmen, und TAX hat einen Einfluss auf den Proteasom-abhängigen Abbau von I κ B. Offensichtlich ist das Proteasom-System der Angriffsort vieler Viren, was mit seiner essentiellen Rolle bei der Immunabwehr und der Zellzyklus-Regulation erklärt werden kann.

Sowohl das vollständige Tat-Protein als auch das Tat Peptid 37-72 können die Zellmembran permeieren (Fawell *et al.*, 1994). Im Vergleich mit dem vollständigen Tat-Protein besitzt das Tat Peptid 37-72 einen sehr ähnlichen Hemmeffekt auf das 20S Proteasom. Um den für den Effekt auf das Proteasom-System zuständigen Bereich des Tat Proteins weiter einzugrenzen, wurden die Tat Peptide Tatpep1, 2, 3 und 4 synthetisiert und getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass der basische Bereich des Tat-Proteins bei der Inhibition des 20S Proteasoms eine essentielle Rolle spielt. Es ist bekannt, dass der basische Bereich die RNA-Bindungsdomäne und die NLS (*Nuclear Location Signal*) (Endo *et al.*, 1989; Hauber *et al.*, 1989) enthält und zuständig ist für den freien Transport des Tat-Proteins durch die Zellmembran (Vives *et al.*, 1997). Diese Region vermittelt die Bindung des Tat-Proteins an die TAR-RNA (Rana *et al.*, 1999) und ist essentiell für die Verstärkung der p300/CBP transkriptionalen Koaktivatoren (Marzio *et al.*, 1998). Das heißt, dass der basische Bereich für unterschiedliche biologische Funktionen notwendig ist. Unsere Experimente zeigen, dass das Tat Peptid Tatpep5, in dem Lys51, Arg52 (Aminosäuren im basischen Bereich) und Asp67 durch Ala substituiert wurden, keinen Hemmeffekt auf das 20S Proteasom und die 11S Regulator-Bindung an das 20S Proteasom hat. Die Aminosäuren Lys51 und Arg52 sind in allen Tat-Proteinen, die aus HIV-1 oder HIV-2 stammen, hoch konserviert.

4.2 Das Tat-Protein beeinflusst die Stabilität der Transkriptionsregulatoren I κ B α und c-Jun

Es ist bekannt, dass zwei Untereinheiten des 19S Regulators, S6b (auch bekannt als TBP1, *Tat-Binding Protein 1*) und S7 (auch bekannt als MSS1, *Mammalian Suppressor of Sgv1*), mit dem Tat-Protein wechselwirken (Nelbock *et al.*, 1990; Shibuya *et al.*, 1992). S6b und S7 gehören zu einer Gruppe von ATPasen, die als AAA (*ATPase-Associated Activity*) –Familie bezeichnet wird (Confalonieri *et al.*, 1995). Sie enthalten eine bzw. zwei hochkonservierte nukleotidbindende Regionen von etwa 200 Aminosäuren. Die untereinander zu etwa 50% identischen ATPasen des 19S Regulators besitzen jeweils eine dieser Regionen. Diese ATPase-Untereinheiten sind vermutlich für die ATP-spaltende Aktivität des 26S Proteasoms verantwortlich.

Die viralen Proteine E7 (*Human Papillomavirus 16 E7 Oncoprotein*) und E1A binden ebenfalls an proteasomale ATPasen. Die Bindung des E7-Proteins stimuliert die S4-ATPase Aktivität, wodurch die Proteolyse beschleunigt werden könnte (Berezutskaya *et al.*, 1997). Dadurch wird vermutlich die Degradation des Retinoblastom-Proteins verstärkt, was zu einer onkogenen Transformation führt (Boyer *et al.*, 1996). Die Bindung mit dem E1A Protein verstärkt die Degradation der Topoisomerase-II- α , wodurch eine Apoptose induziert werden konnte. Eine Folge der Interaktion der viralen Proteine mit dem proteasomalen ATPasen könnte die Aktivierung des Abbaus von Ubiquitin-Konjugaten durch das 26S Proteasom sein, wie es für das Tat-Protein gezeigt wurde (Seeger *et al.*, 1997).

Mit Hilfe des exprimierten Tat-Proteins wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass das Tat-Protein nicht nur an das 20S Proteasom sondern auch an den 19S Regulator binden kann. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Aminosäuren 37-72 des Tat-Proteins auch für die Bindung an den 19S Regulator erforderlich sind. Die meisten Substrate des 26S Proteasoms werden mit Hilfe des Ubiquitin-Systems selektiert. Polyubiquitinierte Substratproteine werden vom 26S Proteasom gebunden und abgebaut. Die Transkriptionsregulatoren c-Jun und I κ B werden durch das Ubiquitin-System abgebaut.

Frühere Daten zeigten, dass das Tat-Protein die Aktivität des 26S Proteasoms erhöht. Aus meinen Ergebnisse geht hervor, dass das exprimierte Tat-Protein den 26S Proteasom-abhängigen Abbau von I κ B α beschleunigt. Dieser Tat-Effekt führt vermutlich zu einer erhöhten Freisetzung und Aktivität von NF- κ B. Tatsächlich konnte eine Aktivierung von NF- κ B durch das Tat-Protein nachgewiesen werden (Westendorp et al., 1995; Demarchi et al., 1996; Chen et al., 1997; Kelly et al., 1999; Manna et al., 2000; Ehret et al., 2001). Dagegen wurde gezeigt, dass das Tat-Protein den Abbau von I κ B α in ausdifferenzierten SK-N-MC Zellen nicht beeinflussen konnte (New et al., 1998). Meiner Meinung nach ist die Diskrepanz auf die Verwendung unterschiedlicher Zellen und Methoden zurückzuführen. Es ist bekannt, dass eine Bindungsstelle für NF- κ B im HIV-1 Promotor enthalten ist (Siebenlist et al., 1994). Die Bindung von NF- κ B an die Tat-Protein-TAR-RNA verstärkt die Initiation und Elongation von HIV-1 auf der Transkriptionsebene. Die Aktivierung von NF- κ B könnte ein weiterer Grund sein, warum das Tat-Protein essentiell bei der HIV-Infektion und -Replikation ist (Westendorp et al., 1995).

Die AP-1 Familie besteht aus den Transkriptionsfaktoren Jun, Fos, und ATF (*Activating Transcription Factor*), die Homo- oder Heterodimere bilden. c-Jun ist ein zentraler Bestandteil von allen AP-1 Komplexen (Karin et al., 1997). Der bisher bekannte Regulationsmechanismus der Stabilität von c-Jun erfolgt über die Phosphorylierung durch die JNK (*Jun N-terminal Kinase*), welche durch den MAP Kinase (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) Weg aktiviert wird. Darüber hinaus wird c-Jun durch das CSN (*COP9 Signalosome*) (Naumann et al., 1999) stabilisiert. Unsere Daten zeigen, dass das Tat-Protein den 26S Proteasom-abhängigen Abbau von c-Jun stimuliert. Dabei ist unklar, ob c-Jun gleichzeitig phosphoryliert oder dephosphoryliert wurde. Gu et al. (Gu et al., 2001) und Mischianti et al. (Mischianti et al., 1999) haben berichtet, dass das Tat-Protein die JNK aktivieren kann. Das würde jedoch zu einer Stabilisierung von c-Jun führen und widerspricht unseren Daten, die einen Tat-Protein-induzierten Abbau von c-Jun zeigen.

4.3 Identifizierung einer gemeinsamen Struktur im HIV-1 Tat-Protein und in der 11S Regulator α -Untereinheit, die für die Konkurrenz der beiden Proteine verantwortlich ist

Frühere Daten (Seeger et al., 1997) und die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren, dass das Tat-Protein mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom konkurriert. Ein Sequenzvergleich erbrachte keine Homologien in der Primärstruktur der beiden Proteine. Nur der Vergleich der vorhandenen Raumstruktur-Daten des Tat-Proteins (Bayer et al., 1995) und von REG α (Knowlton et al., 1997) führte zur Identifizierung einer gemeinsamen Struktur. Diese Struktur wird im Tat-Protein aus den Aminosäuren Lys51 und Arg52 aus der basischen Region und dem Asp67 aus der C-terminalen Region gebildet. Lys51 und Arg52 sind in allen Tat-Varianten hoch konserviert. Das mutierte Tat-Peptid Tatpep5 ist nicht in der Lage, mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom zu konkurrieren. Das bedeutet, dass die identifizierte Struktur essentiell für die Konkurrenz des Tat-Proteins mit dem 11S Regulator ist. Im REG α besteht die gemeinsame Struktur aus den Aminosäuren Glu235, Lys236 und Lys239. Die drei Aminosäuren sind Teil einer geladenen α -Helix, die in der Nähe der 20S Proteasom-Bindungsregion (Aminosäuren 241-249) und in der Nähe der Aktivierungsregion (Aminosäuren 141-149) lokalisiert ist (Zhang et al., 1998). Im Gegensatz zu Lys239 sind Glu235 und Lys236 in allen REG (α , β und γ) konserviert und wurden daher durch Alanin (Ala) substituiert. Die REG α -Mutante (REG α m) kann weder allein noch mit REG β gemeinsam die Aktivität des 20S Proteasoms stimulieren. Andererseits kann REG α m ähnlich wie REG α wt mit sich selbst oder mit REG β Komplexe bilden. Darüber hinaus bindet REG α m an das 20S Proteasom. REG α m ist die erste Mutante mit einem Aminosäureaustausch außerhalb der Aktivierungsstelle des 20S Proteasoms, die an das 20S

Proteasom bindet aber die Aktivität des 20S Proteasoms nicht stimulieren kann. Die Ergebnisse mit REG α m sind ähnlich wie die mit Mutanten der Aktivierungsstelle des 20S Proteasoms (Zhang et al., 1998). Daher wird angenommen, dass die Aminosäuren Glu235 und Lys236 von REG α an der Öffnung (*gating*) bzw. Aktivierung des 20S Proteasoms beteiligt sind.

Viele Faktoren können die Öffnung des 20S Proteasoms bewirken (Whitby et al., 2000). Das REG α alleine kann als heptamerer Komplex mittels seiner Bindungsregion am 20S Proteasom-Komplex binden. Dann erfolgt die Öffnung des 20S Proteasoms mit Hilfe der Aktivierungsregion von REG α . Ähnlich wie REG α kann vermutlich auch das Tat-Protein einen heptameren Komplex bilden. Mit der von uns identifizierten Struktur, gebildet durch die Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67, bindet der Tat-Protein-Komplex am 20S Proteasom. Diese Bindung führt jedoch nicht zur Öffnung des 20S Proteasoms. Die REG α m besitzt die Bindungsregion und die Aktivierungsregion, aber aktiviert das 20S Proteasom ebenfalls nicht. Das heißt, es gibt eine zusätzliche Struktur im REG α , die für die Stimulierung des 20S Proteasoms erforderlich ist. Diese Struktur wird mit hoher Wahrscheinlichkeit von den REG α Aminosäuren Glu235 und Lys236 gebildet.

4.4 Das Tat-Protein hemmt die 11S Regulator-vermittelte Antigenpräsentation

Im Säugetierorganismus existiert ein spezieller Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen. Befallene Zellen signalisieren die Infektion durch Präsentation antigener Peptide auf ihrer Zelloberfläche mittels MHC Klasse I-Molekülen. Das ermöglicht die Erkennung und Eliminierung dieser Zellen durch cytotoxische CD8-T-Zellen.

In unserem experimentellen Modell enthalten die B8 Zellen die immundominanten Epitope des Maus-Cytomegalovirus (MCMV) immediate-early-Proteins pp89. Das pp89 Protein wird durch den Ubiquitin- und 26S Proteasom-abhängigen Abbauweg verdaut. Das immundominante Peptid DMYPHFNATNL wird von einem heterodimeren Peptidtransporter (Knuehl et al., 2001), dem sogenannten TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*), in das ER-Lumen geschleust. Dort bindet es sich an MHC Klasse I-Moleküle und gelangt in einem trimeren Komplex bestehend aus MHC Klasse I-Molekül, β 2 Mikroglobulin und Peptid an die Zelloberfläche (Lehner et al., 1996). T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von CD8⁺ cytotoxischen T-Lymphocyten (CTL) erkennen spezifisch verschiedene Subtypen von MHC Klasse I-Molekülen mit den gebundenen Peptiden. Die Bindung führt über eine Rezeptor-vermittelte Signalkaskade zur Aktivierung und Proliferation der cytotoxischen T-Lymphocyten und zur Lyse der MHC Klasse I Peptid-präsentierenden Zellen (Momburg et al., 1998).

Der 11S Regulator spielt eine Rolle bei der Prozessierung antigener Peptide. Er könnte die Konformation des Proteasoms verändern und damit auch den katalytischen Mechanismus der Peptidhydrolyse (Dick et al., 1996). Der 11S Regulator bewirkt eine bis zu 100fach gesteigerte Produktion immundominanter Epitope (Elliott et al., 1995). Mittels Koimmunpräzipitationen wurde gezeigt, dass das 20S Proteasom gleichzeitig den 19S und 11S Regulator in vivo binden kann (Hendil et al., 1998). Es wird postuliert, dass die Erkennung von Proteinsubstraten und der Zugang zum katalytischen Zentrum durch den 19S-Komplex an einer Seite des Proteasoms ermöglicht wird und der weitere Abbau der entstandenen Intermediate durch den 11S Komplex auf der anderen Seite aktiviert wird. In unseren Experimenten verwendeten wir stabil exprimierende RER α wt- und REG α m-Zellen, um in vivo zu testen, welchen Einfluss die Mutation der RER α Untereinheit auf die Präsentation immundominanter Epitope des pp89 Proteins an der Zell-Oberfläche hat. Die Ergebnisse zeigen, dass der 11S Regulator an der Antigenprozessierung des pp89 Proteins beteiligt ist. Die Zellen, die stabil REG α m exprimieren, zeigen eine deutlich verminderte Antigenpräsentation im Vergleich zu den Zellen die stabil REG α wt exprimieren. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Ergebnisse überein (Groettrup et al., 1996b).

Es ist bekannt, dass das Tat-Protein einen Beitrag zur Unterwanderung des Immunsystems durch das HIV-1 leistet. Ein Mechanismus für diesen Tat-Effekt könnte die Hemmung des Promotors von MHC Klasse I Genen sein (Howcroft et al., 1993). Unsere Ergebnisse zeigen, dass das Tat-Protein auch durch die Konkurrenz mit dem 11S Regulator einen Einfluss auf die Antigenpräsentation hat. Die Ergebnisse mit dem vollständigen Tat-Protein und dem Tat-Peptid Tatpep1 zeigen eine deutliche Hemmung der 11S Regulator-abhängigen Antigenpräsentation eines Epitops des pp89

Proteins. Die Mutation der Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 im Tat-Peptid (Tatpep5) hebt die Hemmung der Antigenpräsentation auf. Das bedeutet, dass die identifizierte Struktur im Tat-Protein für die Hemmung der Antigenpräsentation eine entscheidende Rolle spielt. Viele virale Proteine beeinflussen die Antigenprozessierung und Antigenpräsentation und greifen auf unterschiedlichen Stufen mit verschiedenartigen Mechanismen in die Immunabwehr ein (*Jonathan et al., 1999*). Zum Beispiel haben die HIV-1 Proteine Vpu und Nef einen Effekt auf die Antigenprozessierung und Antigenpräsentation (*Schubert et al., 1998; Le Gall et al., 1998*). Nachdem das HIV in die Zellen eingedrungen ist, werden die viralen Proteine, Tat, Vpu und Nef synthetisiert. Diese Proteine schwächen das Immunabwehr-System und das Virus kann dem Immunsystem entfliehen. Das HIV-Virus kann sich nun in den Wirtszellen (CD4+) vermehren und ausbreiten und das Immunsystem weiter zerstören. Die Folge davon ist AIDS.

5 Zusammenfassung

Das Tat-Protein ist als Transaktivator bei der HIV-1-Infektion für die Replikation und Expression von HIV-1 verantwortlich. Außerdem ist es beteiligt an der Unterwanderung des Immunabwehr-Systems durch das HIV-1. Die Antigenprozessierung und die Antigenpräsentation sind wichtige Prozesse im Immunabwehr-System. Das 20S Proteasom ist als zentraler Bestandteil des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbauweges am Verdau vieler intrazellulärer Proteine und bei der Generierung der durch MHC Klasse-I Moleküle präsentierten Epitope beteiligt. Der 11S Regulator ist ein wichtiger Regulator des 20S Proteasoms und spielt bei der Antigenprozessierung eine Rolle. In vitro konkurriert das Tat-Protein mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom. Daher wurde untersucht, ob das Tat-Protein die 11S Regulator-vermittelte Antigenpräsentation beeinflussen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass das exprimierte Tat-Protein an das zelluläre 20S Proteasom und das 26S Proteasom in vivo bindet. Die Bindungsstelle des Tat-Proteins befindet sich zwischen den Aminosäuren 37-72.

Das exprimierte Tat-Protein konnte den 26S Proteasom-abhängigen Abbau der Transkriptionsregulatoren I κ B und c-Jun verstärken. Für diesen Prozess sind die Aminosäuren 37-72 des Tat-Proteins essentiell. Darüber hinaus sind die Aminosäuren 37-72 für die Hemmung des 20S Proteasoms und für die Konkurrenz mit dem 11S Regulator erforderlich. Durch die Deletion der basischen Domäne des Tat-Peptides 37-72 ging die Hemmung des 20S Proteasoms und die Konkurrenz mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom verloren.

Mittels Computer-gestützter Strukturanalyse wurde eine gemeinsame Struktur im Tat-Protein (Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67) und in der 11S Regulator α -Untereinheit (REG α) (Aminosäuren Glu235, Lys236 und Lys239) identifiziert.

Wild-type REG α (REG α wt), mutiertes REG α (REG α m) (Substitutionen der Aminosäuren Glu235Ala und Lys236Ala) und REG β wurden rekombinant als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Nach Abspaltung des GST-Fusionsanteils erfolgte die biochemische Charakterisierung der Proteine. Die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S Proteasoms ist abhängig von der eingesetzten Menge an REG α wt oder REG α wt + REG β . REG α m oder REG α m + REG β sind nicht in der Lage, das 20S Proteasom zu stimulieren.

REG α m hat keinen Einfluß auf die Komplexbildung mit sich selbst oder mit REG β oder mit dem 20S Proteasom. Die Bindungsfähigkeit an das 20S Proteasom ist vergleichbar mit der von REG α wt. Diese Daten zeigen, dass die Aminosäuren Glu235 und Lys236 von REG α für die Aktivierung des 20S Proteasoms erforderlich sind. Der Einfluss von REG α auf die Antigenpräsentation wurde in Maus B8 Zellen bestätigt, die Epitope des MCMV Proteins pp89 mittels MHC Klasse I Molekülen präsentieren. Eine stabile Überexpression von REG α m führte zu einer deutlichen Reduzierung der Antigenpräsentation im Vergleich zur Überexpression von REG α wt.

Die Mutation des Tat-Peptides 37-72 in den Aminosäuren Lys51Ala, Arg52Ala und Asp67Ala führte zum Verlust der Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des 20S Proteasoms und der Fähigkeit REG α wt vom 20S Proteasom zu verdrängen.

Sowohl das vollständige Tat-Protein als auch das Tat-Peptid 37-72 sind in der Lage, die Präsentation eines pp89 Epitops zu hemmen, während das mutierte Peptid (Lys51Ala, Arg52Ala und Asp67Ala) keine Hemmwirkung aufweist. Diese Daten zeigen, dass das Tat-Protein die 11S Regulator-vermittelte Antigenpräsentation hemmt und somit einen Einfluss auf die Entstehung der Immuninsuffizienz während der AIDS-Erkrankung haben kann.

Literaturverzeichnis

- Ahn JY, Tanahashi N, Akiyama K, Hisamatsu H, Noda C, Tanaka K, Chung CH, Shibmura N, Willy PJ, Mott JD. Primary structures of two homologous subunits of PA28, a gamma-interferon-inducible protein activator of the 20S proteasome. *FEBS Lett* 366, 37-42 (1995)
- Ahn K, Erlander M, Leturcq D, Peterson PA, Fruh K, Yang Y. In vivo characterization of the proteasome regulator PA28. *J Biol Chem* 271, 18237-18242 (1996)
- Adler MW. ABC of Aids: Development of the epidemic. *BMJ* 322, 1226-1229 (2001)
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868-867 (1983)
- Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92, 367-380 (1998)
- Bayer P, Kraft M, Ejchart A, Westendorp M, Frank R, Rosch P. Structural studies of HIV-1 Tat protein. *J Mol Biol* 247, 529-535 (1995)
- Beral V, Peterman TA, Berkelman RL, Jaffe HW. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet* 335, 123-128 (1990)
- Bercovich Z, Kahana C. Involvement of the 20S proteasome in the degradation of ornithine decarboxylase. *Eur J Biochem* 213, 205-210 (1993)
- Berezutskaya E, Bagchi S. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 272, 30135-40 (1997)
- Berkhout B, Gatignol A, Rabson AB, Jeang KT. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell* 62, 757-67 (1990)
- Billiau A. Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 62, 61-130 (1996)
- Boyer SN, Wazer DE, Band V.E. 7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 4620-4624 (1996)
- Brockmeyer N. German-Austrian Guidelines for HIV-therapy during pregnancy--status: May/June 1998- common statement of the Deutsche AIDS-Gesellschaft (DAIG) and the Osterreichische AIDS-Gesellschaft (OAG). *Eur J Med Res* 4, 35-42 (1999)
- Cerundolo V, Benham A, Braud V, Mukherjee S, Gould K, Macino B, Neeffes J, Townsend A. The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol* 27, 336-341 (1997)
- Chen P, Mayne M, Power C, Nath A. The Tat protein of HIV-1 induces tumor necrosis factor-alpha production. Implications for HIV-1-associated neurological diseases. *J Biol Chem* 272, 22385-22388 (1997)
- Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9, 1586-1597 (1995)
- Clavel F, Guyader M, Guetard D, Salle M, Montagnier L, Alizon M. Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324, 691-695 (1986)
- Confalonieri F, Duguet M. A. 200-amino acid ATPase module in search of a basic function. *Bioessays* 17, 639-650 (1995)
- Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL, Rock KL. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation.

J Biol Chem 272, 13437-13445 (1997)

Dal Maso L, Serraino D, Franceschi S. Epidemiology of HIV-associated malignancies. *Cancer Treat Res* 104, 1-18 (2001)

de Baar MP, van Dooren MW, de Rooij E, Bakker M, van Gemen B, Goudsmit J, de Ronde A. Single rapid real-time monitored isothermal RNA amplification assay for quantification of human immunodeficiency virus type 1 isolates from groups M, N, and O. *J Clin Microbiol* 39, 1378-1384 (2001)

Demarchi F, d'Adda di Fagagna F, Falaschi A, Giacca M. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 70, 4427-4437 (1996)

Dragic T. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J Gen Virol* 82, 1807-1814 (2001)

Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M. Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 267, 22369-22377 (1992)

Dubiel W, Ferrell K, Rechsteiner M. Peptide sequencing identifies MSS1, a modulator of HIV Tat-mediated transactivation, as subunit 7 of the 26 S protease. *FEBS Lett* 323, 276-278 (1993)

Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild H, Rammensee HG. Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86, 253-262 (1996)

Ehret A, Li-Weber M, Frank R, Krammer PH. The effect of HIV-1 regulatory proteins on cellular genes: derepression of the IL-2 promoter by Tat. *Eur J Immunol* 31, 1790-1799 (2001)

Elliott T, Willis A, Cerundolo V, Townsend A. Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum. *J Exp Med* 181, 1481-1491 (1995)

Endo S, Kubota S, Siomi H, Adachi A, Oroszlan S, Maki M, Hatanaka M. A region of basic amino-acid cluster in HIV-1 Tat protein is essential for trans-acting activity and nucleolar localization. *Virus Genes* 3, 99-110 (1989)

Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debre P, Theodorou I, Combadiere C. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* 287, 2274-2277 (2000)

Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B, Barsoum J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 664-668 (1994)

Frankel AD. Activation of HIV transcription by Tat. *Curr Opin Genet Dev* 2, 293-298 (1992)

Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL. Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365, 264-267 (1993)

Gallo RC. Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an important component of a vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8324-8326 (1999)

Gelmann EP, Franchini G, Manzari V, Wong-Staal F, Gallo RC. Molecular cloning of a unique human T-cell leukemia virus (HTLV-II_{Mo}). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 993-997 (1984)

Gille C, Goede A, Preissner R, Rother K, Frommel C. Conservation of substructures in proteins: interfaces of secondary structural elements in proteasomal subunits. *J Mol Biol* 299, 1147-1154 (2000)

Grand RJ, Turnell AS, Mason GG, Wang W, Milner AE, Mymryk JS, Rookes SM, Rivett AJ, Gallimore PH. Adenovirus early region 1A protein binds to mammalian SUG1-a regulatory component of the proteasome. *Oncogene* 18, 449-458 (1999)

Gray CW, Slaughter CA, DeMartino GN. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol* 236, 7-15 (1994)

- Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, Kloetzel PM. A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. *Eur J Immunol* 26, 863-869 (1996)
- Groettrup M, Soza A, Eggers M, Kuehn L, Dick TP, Schild H, Rammensee HG, Koszinowski UH, Kloetzel PM. A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. *Nature* 381, 166-168 (1996)
- Groettrup M, Soza A, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency. *Immunol Today* 17, 429-435 (1996)
- Gu Y, Wu RF, Xu YC, Flores SC, Terada LS. HIV Tat activates c-Jun amino-terminal kinase through an oxidant-dependent mechanism. *Virology* 286, 62-71 (2001)
- Hauber J, Malim MH, Cullen BR. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 63, 1181-1187 (1989)
- Hendil KB, Khan S, Tanaka K. Simultaneous binding of PA28 and PA700 activators to 20 S proteasomes. *Biochem J* 332, 749-754 (1998)
- Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273, 1725-1728 (1996)
- Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 8, 67-113 (1992)
- Howcroft TK, Strebel K, Martin MA, Singer DS. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science* 260, 1320-1322 (1993)
- Hu Z, Zhang Z, Doo E, Coux O, Goldberg AL, Liang TJ. Hepatitis B virus X protein is both a substrate and a potential inhibitor of the proteasome complex. *J Virol* 73, 7231-7240 (1999)
- Huang LM, Joshi A, Willey R, Orenstein J, Jeang KT. Human immunodeficiency viruses regulated by alternative trans-activators: genetic evidence for a novel non-transcriptional function of Tat in virion infectivity. *EMBO J* 13, 2886-2896 (1994)
- Jakobovits A, Smith DH, Jakobovits EB, Capon DJ. A discrete element 3' of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and HIV-2 mRNA initiation sites mediates transcriptional activation by an HIV trans activator. *Mol Cell Biol* 8, 2555-2561 (1988)
- Jariel-Encontre I, Pariat M, Martin F, Carillo S, Salvat C, Piechaczyk M. Ubiquitinylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 270, 11623-11627 (1995)
- Jeang KT, Gatignol A. Comparison of regulatory features among primate lentiviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 188, 123-144 (1994)
- Jonathan EC, Bernhard EJ, McKenna WG. How does radiation kill cells? *Curr Opin Chem Biol* 3, 77-83 (1999)
- Karin M, Liu Zg, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-246 (1997)
- Kellogg JA, Atria PV, Sanders JC, Eyster ME. Intra- and interlaboratory variabilities of results obtained with the Quantiplex human immunodeficiency virus type 1 RNA bDNA assay, version 3.0. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 560-563 (2001)
- Kelly A, Powis SH, Glynne R, Radley E, Beck S, Trowsdale J. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353, 667-668 (1991)
- Kelly GD, Morris CB, Offermann MK. Lack of responsiveness of a nuclear factor-kappaB-regulated promoter to transactivation by human immunodeficiency virus 1 Tat in HeLa cells. *Virology* 263, 128-138 (1999)
- Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 179-187 (2001)
- Knowlton JR, Johnston SC, Whitby FG, Realini C, Zhang Z, Rechsteiner M, Hill CP. Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha). *Nature* 390, 639-643 (1997)
- Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB. Evidence indicating that the human proteasome is a complex

dimer. *J Mol Biol* 229, 14-19 (1993)

Knuehl C, Spee P, Ruppert T, Kuckelkorn U, Henklein P, Neefjes J, Kloetzel PM. The murine cytomegalovirus pp89 immunodominant H-2Ld epitope is generated and translocated into the endoplasmic reticulum as an 11-mer precursor peptide. *J Immunol* Aug 167, 1515-1521 (2001)

Kuehn L, Dahlmann B. Reconstitution of proteasome activator PA28 from isolated subunits: optimal activity is associated with an alpha,beta-heteromultimer. *FEBS Lett* 394, 183-186 (1996)

Le Gall S, Erdtmann L, Benichou S, Berlioz-Torrent C, Liu L, Benarous R, Heard JM, Schwartz O. Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* 8, 483-495 (1998)

Lehner PJ, Cresswell P. Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol* 8, 59-67 (1996)

Lowe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme Protein* 47, 252-273 (1993)

Ma CP, Slaughter CA, DeMartino GN. Identification, purification, and characterization of a protein activator (PA28) of the 20 S proteasome (macropain). *J Biol Chem* 267, 10515-10523 (1992)

Manna SK, Aggarwal BB. Differential requirement for p56lck in HIV-tat versus TNF-induced cellular responses: effects on NF-kappa B, activator protein-1, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol* 164, 5156-5166 (2000)

Marzio G, Tyagi M, Gutierrez MI, Giacca M. HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13519-13524 (1998)

Mischiati C, Pironi F, Milani D, Giacca M, Mirandola P, Capitani S, Zauli G. Extracellular HIV-1 Tat protein differentially activates the JNK and ERK/MAPK pathways in CD4 T cells. *AIDS* 13, 1637-1645 (1999)

Momburg F, Hammerling GJ. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol* 68, 191-256 (1998)

Naumann M, Bech-Otschir D, Huang X, Ferrell K, Dubiel W. COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem* 274, 35297-35300 (1999)

Nelbock P, Dillon PJ, Perkins A, Rosen CA. A cDNA for a protein that interacts with the human immunodeficiency virus Tat transactivator. *Science* 248, 1650-1653 (1990)

New DR, Maggirwar SB, Epstein LG, Dewhurst S, Gelbard HA. HIV-1 Tat induces neuronal death via tumor necrosis factor-alpha and activation of non-N-methyl-D-aspartate receptors by a NFkappaB-independent mechanism. *J Biol Chem* 273, 17852-17858 (1998)

Nikaido T, Shimada K, Shibata M, Hata M, Sakamoto M, Takasaki Y, Sato C, Takahashi T, Nishida Y. Cloning and nucleotide sequence of cDNA for Ki antigen, a highly conserved nuclear protein detected with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 79, 209-214 (1990)

Orlowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 29, 10289-10297 (1990)

Orlowski M. The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: diverse functions of an intracellular particle. *J Lab Clin Med* 121, 187-189 (1993)

Ortiz-Navarrete V, Seelig A, Gernold M, Frentzel S, Kloetzel PM, Hammerling GJ. Subunit of the '20S' proteasome (multicatalytic proteinase) encoded by the major histocompatibility complex. *Nature* 353, 662-664 (1991)

Palombella VJ, Rando OJ, Goldberg AL, Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78, 773-785 (1994)

Pamer EG. Direct sequence identification and kinetic analysis of an MHC class I-restricted Listeria

- monocytogenes CTL epitope. *J Immunol* 152, 686-694 (1994)
- Peters JM, Cejka Z, Harris JR, Kleinschmidt JA, Baumeister W. Structural features of the 26 S proteasome complex. *J Mol Biol* 234, 932-937 (1993)
- Preissner R, Goede A, Frommel C. Dictionary of interfaces in proteins (DIP). Data bank of complementary molecular surface patches. *J Mol Biol* 280, 535-550 (1998)
- Preissner R, Goede A, Frommel C. Homonyms and synonyms in the Dictionary of Interfaces in Proteins (DIP). *Bioinformatics* 15, 832-836 (1999)
- Rana TM, Jeang KT. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* 365, 175-185 (1999)
- Realini C, Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M. Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 269, 20727-20732 (1994)
- Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V. The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 345, 1-15 (2000)
- Rivett AJ. The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J Biol Chem* 264, 12215-12219 (1989)
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78, 761-771 (1994)
- Rousset R, Desbois C, Bantignies F, Jalinot P. Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* 381, 328-331 (1996)
- Saloojee H, Violari A. Regular review: HIV infection in children. *BMJ* 323, 670-674 (2001)
- Schubert U, Anton LC, Bacik I, Cox JH, Bour S, Bennink JR, Orlowski M, Strebel K, Yewdell JW. CD4 glycoprotein degradation induced by human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein requires the function of proteasomes and the ubiquitin-conjugating pathway. *J Virol* 72, 2280-2288 (1998)
- Seeger M, Ferrell K, Frank R, Dubiel W. HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. *J Biol Chem* 272, 8145-8148 (1997)
- Seufert W, Futcher B, Jentsch S. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of S- and M-phase cyclins. *Nature* 373, 78-81 (1995)
- Shibuya H, Irie K, Ninomiya-Tsuji J, Goebel M, Taniguchi T, Matsumoto K. New human gene encoding a positive modulator of HIV Tat-mediated transactivation. *Nature* 357, 700-702 (1992)
- Shimbara N, Nakajima H, Tanahashi N, Ogawa K, Niwa S, Uenaka A, Nakayama E, Tanaka K. Double-cleavage production of the CTL epitope by proteasomes and PA28: role of the flanking region. *Genes Cells* 2, 785-800 (1997)
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10, 405-455 (1994)
- Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM. Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J Exp Med* 191, 503-514 (2000)
- Song X, Mott JD, von Kampen J, Pramanik B, Tanaka K, Slaughter CA. A model for the quaternary structure of the proteasome activator PA28. *Biol Chem* 271, 26410-26417 (1996)
- Stoltze L, Nussbaum AK, Sijts A, Emmerich NP, Kloetzel PM, Schild H. The function of the proteasome system in MHC class I antigen processing. *Immunol Today* 21, 317-319 (2000)
- Tanaka K, Tanahashi N, Tsurumi C, Yokota KY, Shimbara N. Proteasomes and antigen processing. *Adv Immunol* 64, 1-38 (1997)

- Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J* 14, 2876-2883 (1995)
- Treier M, Staszewski LM, Bohmann D. Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* 78, 787-798 (1994)
- Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272, 16010-16017 (1997)
- Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, Los M, Krammer PH, Droge W, Lehmann V. HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J* 14, 546-554 (1995)
- Whitby FG, Masters EI, Kramer L, Knowlton JR, Yao Y, Wang CC, Hill CP. Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* 408, 115-120 (2000)
- Yamey G, Rankin W, Feachem R. Twenty years of AIDS, and no end in sight. A BMJ theme issue will refocus attention on this catastrophic epidemic. *BMJ* 322, 1440-1444 (2001)
- Yoshimura T, Kameyama K, Takagi T, Ikai A, Tokunaga F, Koide T, Tanahashi N, Tamura T, Cejka Z, Baumeister W. Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol* 111, 200-211 (1993)
- Zhang Z, Clawson A, Realini C, Jensen CC, Knowlton JR, Hill CP, Rechsteiner M. Identification of an activation region in the proteasome activator REGalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2807-2811 (1998)

Publikationen

Propper C, Huang X, Roth J, Sorg C, Nacken W. Analysis of the MRP8-MRP14 protein-protein interaction by the two-hybrid system suggests a prominent role of the C-terminal domain of S100 proteins in dimer formation. *J Biol Chem* 274, 183-188 (1999)

Naumann M, Bech-Otschir D, Huang X, Ferrell K, Dubiel W. COP9 signalosome-directed c-Jun activation/stabilization is independent of JNK. *J Biol Chem* 274, 35297-35300 (1999)

Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* 20, 1630-1639 (2001)

Pollmann C, Huang H, Mail J, Bech-Otschir D, Naumann M, Dubiel W. The Constitutive Photomorphogenesis 9 Signalosome Directs Vascular Endothelial Growth Factor Production in Tumor Cells. *Cancer Research* 61, 1630-1639 (2001)

Huang, X, Seifert U, Salzmann U, Sijts E, Henklein, Preißner R, Henke W, Kloetzel PM, Dubiel W. The HIV-1 Tat Protein suppresses 11S regulator/PA28-dependent antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA*, submitted

Danksagung

Bei Herrn Professor Dubiel möchte ich mich sehr für die intensive Betreuung und die Ermöglichung der Arbeit in seinem Labor bedanken.

Ein ganz herzliches Dankeschön geht an die Kolleginnen und Kollegen unserer Arbeitsgruppe, Frau Dr. Bech-Otschir, Frau Dumdey, Dr. Berndt, Dr. Braumann und Herrn Uhle, die mir mit vielen Tips und Tricks geholfen haben

Außerdem danke ich dem Direktor des Instituts für Biochemie, Herrn Prof. Kloetzel. In seinem Labor konnte ich unter sehr guten Bedingungen arbeiten. Weiterhin danke ich den Mitgliedern von Herrn Prof. Kloetzel's Arbeitsgruppe, Frau Dr. Seifert, Frau Drung, Frau Salzmann und Herrn Giesebrecht.

Lebenslauf

Familienname	Huang
Vorname	Xiaohua
Geschlecht	männlich
Geburtstag und –ort	09.07.1965, Hubei, Volksrepublik China
Staatsangehörigkeit:	Volksrepublik China
Familienstand	verheiratet,-ein Kind
Adresse	Belfaster Straße 16, 13349 Berlin

Akademische Grade

1986	„ <i>Bachelor</i> “ für Medizin an der Tongji Medizinischen Universität in Wuhan
1991	„ <i>Master</i> “ für Medizin am Nationalen Institut für Biologische Produkte in Wuhan

Hochschulstudium

9.1981 - 7.1986	Studium an der Tongji Medizinischen Universität in Wuhan. Hauptfach Medizin
9.1988-7.1991	Studium am Nationalen Institut für Biologische Produkte in Wuhan. Hauptfächer Klinische Mikrobiologie und Immunologie. Thema für „ <i>Master</i> “: <i>Identification and Application of Hybridomas Secreting Monoclonal Antibodies against Human Fibronectin</i>

Berufliche Tätigkeit

1986 bis 1988	Arzt im Krankenhaus in Hubei
1991 bis 1996	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Nationalen Institut für Biologische Produkte in Wuhan
1996 bis 1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Experimentelle Dermatologie, Universität Münster
Seit 1998	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Abteilung für Experimentelle Chirurgie/Molekularbiologie, Chirurgie, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

Eidstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, 11.12.2001